

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

03.10.03

#3

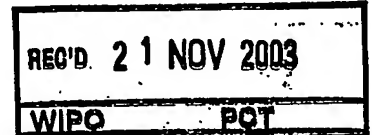
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 0 月 4 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 2 9 2 8 5 3
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 2 9 2 8 5 3]

出 願 人 麒麟麦酒株式会社
Applicant(s):

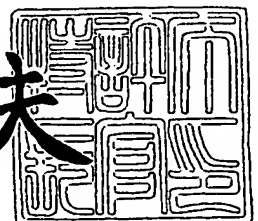


PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 1 月 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-0713

【提出日】 平成14年10月 4日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 ヒト人工染色体（H A C）ベクター

【請求項の数】 33

【発明者】

 【住所又は居所】 鳥取県米子市西町 8 6 鳥取大学医学部生命科学科内

 【氏名】 押村 光雄

【発明者】

 【住所又は居所】 鳥取県米子市西町 8 6 鳥取大学医学部生命科学科内

 【氏名】 加藤 基伸

【発明者】

 【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町 3 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研
 究所内

 【氏名】 富塚 一磨

【発明者】

 【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町 3 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研
 究所内

 【氏名】 黒岩 義巳

【発明者】

 【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町 3 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研
 究所内

 【氏名】 掛田 実

【特許出願人】

 【識別番号】 000253503

 【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100122389

【弁理士】

【氏名又は名称】 新井 栄一

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9809317

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト人工染色体 (HAC) ベクター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 長腕遠位及び／又は短腕遠位が削除されたヒト 21 番染色体断片を含むことを特徴とするヒト人工染色体ベクター。

【請求項 2】 ヒト 21 番染色体断片が約 2 ～ 16 Mb である、請求項 1 記載のヒト人工染色体ベクター。

【請求項 3】 ヒト 21 番染色体の長腕遠位が 21 q 11 領域内で削除されている、請求項 1 又は 2 記載のヒト人工染色体ベクター。

【請求項 4】 ヒト 21 番染色体の長腕遠位が AL 163204 において削除されている、請求項 3 記載のヒト人工染色体ベクター。

【請求項 5】 ヒト 21 番染色体の短腕遠位が 21 p 領域内で削除されている、請求項 1 又は 2 記載のヒト人工染色体ベクター。

【請求項 6】 ヒト 21 番染色体の短腕遠位が AL 163201 において削除されている、請求項 5 記載のヒト人工染色体ベクター。

【請求項 7】 ヒト 21 番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位が挿入されていることを特徴とする、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のヒト人工染色体ベクター。

【請求項 8】 部位特異的組換え酵素が Cre 酵素である、請求項 7 記載のヒト人工染色体ベクター。

【請求項 9】 部位特異的組換え酵素の認識部位が loxP 配列である、請求項 7 記載のヒト人工染色体ベクター。

【請求項 10】 部位特異的組換え酵素の認識部位が長腕近位の AL 163203 に挿入されている、請求項 7 ～ 9 のいずれか 1 項に記載のヒト人工染色体ベクター。

【請求項 11】 長腕遠位及び／又は短腕遠位の削除が人工テロメア配列との置換によるものである、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載のヒト人工染色体ベクター。

【請求項 12】 ヒト人工染色体ベクターの作製方法であって、以下のステ

ップ:

(a) ヒト 21 番染色体を保持する細胞を得るステップ;

(b) 上記ヒト 21 番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ;並びに

(c) 上記ヒト 21 番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ;
を含む、上記作製方法。

【請求項 13】 ステップ (a) において、ヒト 21 番染色体を保持する細胞が相同組換え効率の高いものである、請求項 12 記載の作製方法。

【請求項 14】 相同組換え効率の高い細胞がニワトリ DT40 細胞由来のものである、請求項 13 記載の作製方法。

【請求項 15】 ステップ (b) において、ヒト 21 番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位の削除を人工テロメア配列との置換により行うものである、請求項 12～14 のいずれか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 16】 ステップ (b) において、ヒト 21 番染色体の長腕遠位を AL163204 において削除する、請求項 12～15 のいずれか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 17】 ステップ (b) において、ヒト 21 番染色体の短腕遠位を AL163201 において削除する、請求項 12～15 のいずれか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 18】 ステップ (c) において、部位特異的組換え酵素が Cre 酵素である、請求項 12～17 のいずれか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 19】 ステップ (c) において、部位特異的組換え酵素の認識部位が loxP 配列である、請求項 12～17 のいずれか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 20】 部位特異的組換え酵素の認識部位を長腕近位の AL163203 に挿入する、請求項 12～19 のいずれか 1 項に記載の作製方法。

【請求項 21】 請求項 12～20 のいずれか 1 項に記載の作製方法により得られる、ヒト人工染色体ベクター。

【請求項 22】 請求項 21 記載のヒト人工染色体ベクターを保持する細胞

。【請求項 23】 請求項 12～20 のいずれか 1 項に記載された作製方法において、以下のステップ：

(d) 部位特異的組換え酵素の存在下にてヒト 21 番染色体に外来 DNA を挿入するステップ；

をさらに含むことを特徴とする、外来 DNA を含むヒト人工染色体ベクターの作製方法。

【請求項 24】 請求項 23 記載の作製方法により得られる、外来 DNA を含むヒト人工染色体ベクター。

【請求項 25】 請求項 24 記載の外来 DNA を含むヒト人工染色体ベクターを保持する細胞。

【請求項 26】 外来 DNA を受容細胞に導入する方法であって、以下のステップ：

(a) ヒト 21 番染色体を保持する供与細胞を得るステップ；

(b) 上記ヒト 21 番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；

(c) 上記ヒト 21 番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ；

(d) 部位特異的組換え酵素の存在下にて上記ヒト 21 番染色体に外来 DNA を挿入するステップ；

(e) 上記ヒト 21 番染色体を保持する供与細胞からマイクロセルを調製するステップ；

(f) 上記マイクロセルと受容細胞とを融合するステップ；並びに

(g) 融合した受容細胞において外来 DNA の導入を確認するステップ；を含む、上記導入方法。

【請求項 27】 受容細胞が動物細胞である、請求項 26 記載の導入方法。

【請求項 28】 動物細胞が哺乳動物細胞である、請求項 27 記載の導入方法。

【請求項 29】 外来 DNA を発現する細胞の作製方法であって、以下のス

テップ:

- (a) ヒト 21 番染色体を保持する供与細胞を得るステップ;
 - (b) 上記ヒト 21 番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ;
 - (c) 上記ヒト 21 番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ;
 - (d) 部位特異的組換え酵素の発現下にて上記ヒト 21 番染色体に外来 DNA を挿入するステップ;
 - (e) 上記ヒト 21 番染色体を保持する供与細胞からマイクロセルを調製するステップ;
 - (f) 上記マイクロセルと受容細胞とを融合するステップ;並びに
 - (g) 融合した受容細胞において外来 DNA を発現する細胞を選択するステップ;
- を含む、上記作製方法。

【請求項 30】 受容細胞が動物細胞である、請求項 29 記載の導入方法。

【請求項 31】 動物細胞が哺乳動物細胞である、請求項 30 記載の導入方法。

【請求項 32】 タンパク質の製造方法であって、以下のステップ:

- (a) ヒト 21 番染色体を保持する供与細胞を得るステップ;
- (b) 上記ヒト 21 番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ;
- (c) 上記ヒト 21 番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ;
- (d) 部位特異的組換え酵素の発現下にて上記ヒト 21 番染色体にタンパク質をコードする外来 DNA を挿入するステップ;
- (e) 上記ヒト 21 番染色体を保持する供与細胞からマイクロセルを調製するステップ;
- (f) 上記マイクロセルと受容細胞とを融合するステップ;
- (g) 融合した受容細胞を培地中で培養するステップ;並びに

(h) 得られる培養物から上記タンパク質を採取するステップ；を含む、上記製造方法。

【請求項 33】 タンパク質が、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、免疫グロブリン、トロンボポエチン、成長ホルモン、第八因子、インスリン、インターフェロン、インターロイキン 2、インターロイキン 6、及びインターロイキン 12 からなる群より選択されるものである、請求項 22 記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト人工染色体（HAC）ベクター及びその作製方法に関する。また本発明は、ヒト人工染色体ベクターを用いた外来 DNA の導入方法及び外来 DNA 発現細胞の作製方法に関する。さらに本発明は、タンパク質の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

哺乳動物細胞に外来遺伝子を導入発現させるためのベクターは、基礎生命科学研究において必須のツールであるばかりでなく、その成果の産業（例：医薬品の大量生産）や医療（例：遺伝子治療）における実用化の際に重要な役割を果たしてきた。1970年代後半以降の遺伝子工学技術の進展は、大腸菌や酵母における特定の遺伝子 DNA 断片の単離と増幅（遺伝子クローニング）を容易にした。従来、哺乳動物細胞への遺伝子導入には、クローン化 DNA が用いられてきた。実際には、発現させたい遺伝子（cDNA）のコード領域に哺乳動物細胞で機能し得るプロモーターやポリ A 付加部位などを連結した人工的な発現ユニットを作製するか、あるいはコード領域に加えて、本来のプロモーターやポリ A 付加部位等を含むゲノム DNA 断片などを含む、大腸菌のプラスミド（最長 20 kb 程度：環状）、コスミド（最長 40 kb 程度：環状）、細菌人工染色体（BAC；最長 200 kb：環状）、酵母人工染色体（YAC；最長 1 Mb：直鎖状）を環状

で又は線状化して作製し、それらを細胞にトランスフェクション又はインジェクションすることが汎用されている。導入されたベクターDNAが哺乳動物由来の複製起点を含まない場合、ベクターは細胞に導入された後複製することができず、細胞の分裂に伴って失われていくため、導入遺伝子の発現は一過性となる。一方、複製起点を含む場合は細胞内で一時的に多コピー化するが、細胞分裂に伴う娘細胞への分配が均等になされないため、選択圧がない場合には次第に失われていく。よってこの場合も発現は一過性となる。薬剤耐性遺伝子を同時に導入し、薬剤による選択圧をかけることによって導入遺伝子を構成的に発現する細胞株を選別することは可能だが、その場合、導入された遺伝子は宿主細胞の染色体に組み込まれる（インテグレーション）。この組み込みは、導入遺伝子及び宿主染色体の両方に影響を与える。宿主染色体にとっては、遺伝子が破壊される可能性がある（非特許文献1）。導入される遺伝子にとっては、コピー数が制御されない、不活性化される（非特許文献2）、組み込まれた宿主染色体上の制御配列の影響を受ける（非特許文献3及び4）、などの問題点が残る。このため宿主染色体を破壊することなく、一定コピー数の遺伝子が導入可能な方法の開発が望まれる。このような問題点を解決するための一つの方法は、ヒトを含む動物細胞を宿主として自律複製／分配が可能な人工染色体を構築し、これをベクターとして動物細胞に遺伝子を導入することである。

【0003】

(1) ヒト人工染色体（HAC）の構築

従来、外来遺伝子を発現させるためのベクターを構築するという目標と、一方で細胞内での自律複製分配に必要な構造を特定するという生物学的側面から、動物細胞を宿主としたヒト人工染色体（Human Artificial Chromosome；以下、「HAC」ともいう）の構築が試みられてきた。HAC構築のアプローチには（A）ボトムアップアプローチ、（B）自然発生染色体断片の利用、及び（C）トップダウンアプローチ（天然の染色体をトリミング）の3種がある。

【0004】

(A) ボトムアップアプローチ

大腸菌や酵母では自律複製／分配に必要なDNA配列が特定されており、宿主

細胞内で一定のコピー数が維持される人工染色体が構築されている（BACないしYAC）。同様の発想から、クローン化された配列既知のDNA断片を動物細胞に導入してアセンブルするという、ボトムアップアプローチによるHAC構築が試みられてきた。ヒト染色体セントロメアの構成要素であるアルフォイド配列約100kbを含むYAC由来の薬剤耐性遺伝子とヒトのテロメア配列を付加し、ヒト線維肉腫細胞株HT1080に導入した例が報告されている（非特許文献5）。薬剤耐性細胞株では自律複製／分配が可能な人工染色体が構築されていたが、導入したDNA配列そのものが細胞に保持されているのではなく増幅による再構成が生じており、細胞に保持される配列構造は明らかでない。

またHACを構築することが目的であって、外来遺伝子の挿入を検討するには至っていない。

【0005】

（B）自然発生断片の利用

染色体はそれ自身が遺伝子の集合体であり、自律複製・分配に必要な要素を備えている。YACなど既存のクローニングベクターの容量を超えるMb単位の巨大遺伝子を導入する目的で、一本の染色体又はその断片を遺伝子導入のツールとして利用することは、微小核細胞融合法により実現されている。マウス胚幹細胞に抗体遺伝子を含むヒト14番、2番、22番染色体断片を移入し、キメラ個体が作製できること、移入された抗体遺伝子が個体中で機能発現すること、ヒト染色体断片がキメラ個体で安定に保持されること、生殖系列を経て次世代伝達可能なことが示された（非特許文献6及び7）。この例では、発現させたい遺伝子がついている染色体そのものをベクターとして利用することの有効性が示された。しかし目的とする遺伝子毎に染色体改変を行うことは現実的でない。染色体断片のベクターとしての利点を生かしなおかつその汎用性を高めるには、基本骨格となる染色体ベクターを用意し、これに目的とする遺伝子を簡便に挿入できることが望ましい。

【0006】

このような目標のもと、染色体自然断片を利用して外来遺伝子を発現させる試みが報告されている。ヒト1番染色体由来の放射線染色体断片（5.5Mb）を

ベクターとし、IL-2 遺伝子 (cDNA) 又は CFTR 遺伝子 (ヒトゲノム DNA) の導入と機能発現が報告されている (非特許文献 8 及び 9)。宿主はハムスター線維芽細胞 (CHO) を用いている。この断片化されたミニ染色体への目的遺伝子の導入には、アルフォイド DNA を併用してヒト 1 番染色体セントロメア領域への挿入を期待しているが、詳細な挿入位置及びコピー数は特定されていない。IL-2 依存性のマウスリンパ芽球細胞は IL-2 ミニ染色体を保持する CHO 細胞との細胞融合により IL-2 非依存的に増殖可能となり、機能相補が認められた。また、CFTR ミニ染色体を保持する CHO 細胞では、cAMP 刺激による塩素イオン放出が認められ、CFTR 阻害剤の添加によりその塩素イオン放出が抑制された。これらは染色体断片をベクターとして外来遺伝子を挿入・発現するための系を示したが、構造が明らかでなく、外来 DNA の挿入が制御されていないという問題が残っている。

【0007】

放射線雑種細胞由来の染色体断片 (2 ~ 3 Mb) はハムスター細胞において安定に保持され、ヒト 1 番染色体セントロメアと長腕の一部及び SDHC (succinate dehydrogenase complex, subunit C) 遺伝子を含む。SDHC 領域での相同組換えにより G418 耐性遺伝子が挿入された。マウス細胞 (L 及び 3T3) を用いて X 線細胞融合を行い、G418 耐性雑種細胞を得た (非特許文献 10)。この HAC は、染色体自然断片を利用しているためその構造は明らかでない。外来遺伝子を部位特異的に HAC に導入するために相同組換えを用いたが、導入効率が低く汎用性は低い。微小核細胞融合法は用いていないので、目的の染色体断片以外にも宿主染色体が共存する。染色体をベクターとして外来遺伝子を発現するという発想を提示するにすぎない。

【0008】

また、染色体自然断片 (環状) に loxP サイトをランダム挿入し、薬剤耐性遺伝子 (hprt) の再構成を指標に外来遺伝子 (ハイグロマイシン耐性遺伝子) を挿入した例が報告されている (非特許文献 11)。この環状染色体はヒト 20 番染色体のセントロメアと 1 番染色体の一部 (p22 領域) を含むが、自然断片のため、配列は特定されていない。外来遺伝子を Cre/loxP システムに

よる部位特異的組換えにより導入しているが、染色体上への $loxP$ 挿入はランダムであり、その構成は不明である。一方で微小核融合によるマウス ES 細胞への移入、キメラ個体の作製、子孫伝達が示されている。染色体自然断片を利用した点、及び $loxP$ サイトの挿入位置がランダムであるという点を除いて、人工染色体に目的遺伝子を挿入する手法は簡便ではあるが、患者（軽度の精神発達遅滞）由来の異常染色体を利用したことは安全性の点で問題が残り、実用的とはいえない。

【0009】

(C) トップダウンアプローチ

染色体自然断片を細胞に移入する場合、目的の遺伝子以外にも移入した染色体断片からその他多くの遺伝子が同時に発現することになる。マウス ES 細胞の実験では、ヒト染色体ごとに安定性が異なること、導入した染色体断片が大きいほどこれを保持する細胞のキメラ個体中での寄与率が下がることが知られている。余分な遺伝子の発現は染色体断片を保持する宿主細胞の増殖を妨げると推測される。そこで染色体改変によって余分な遺伝子を取り除くことで、移入染色体断片の保持率が上がると考えられる。

【0010】

染色体の一部を削除する方法として、クローン化したテロメア配列を相同組換えにより導入し、染色体を短縮する技術（テロメアトランケーション）が報告されている（非特許文献12）。しかし多くの動物種の体細胞は相同組換えの頻度が極端に低いため、組換え体の取得には多大な労力を要する。これに対し高頻度に相同組換えを起こすニワトリ細胞株 DT40 を染色体改変の宿主として利用することで、効率的な染色体改変が可能になった（非特許文献13）。ヒト X 染色体を微小核細胞融合法によって DT40 細胞株に移入し、テロメアトランケーションを行った例が報告されている（非特許文献14）。短腕及び長腕の削除により 2.4 Mb の線状ミニ染色体が構築された。ミニ染色体はハムスター、ヒト細胞でも安定に保持されたが、コピー数の変化が見られた。HAC の安定性を確認しているにすぎず、これに外来の遺伝子を導入してベクターとして利用するには至っていない。

【0011】

またはマスター細胞を宿主としてヒトY染色体をテロメアトランケーションにより短縮し、宿主細胞中で安定に保持される約4Mbのミニ染色体を構築した例も報告されている（非特許文献15）。このミニ染色体を微小核細胞融合法によりマウスES細胞に移入したが、不安定であった。染色体再構成によってマウスセントロメア配列を取り込んだ派生ミニ染色体がES細胞中で安定性を獲得したため（非特許文献16）、キメラマウスを作製したところ、生殖系列伝達が確認された（非特許文献17）。キメラ染色体がマウス個体で保持されることは示されたが、その構造は染色体再構成のため不明であり、さらに外来遺伝子の導入及び発現については検討されていない。

【0012】

(2) HACへの外来遺伝子の挿入

上述したようなベクターとしてのHAC構築と並んで重要なことは、HACに目的の遺伝子を導入する方法の確立である。しかし前述の如く現時点ではHAC構築自体が途上の段階であり、外来遺伝子の導入については薬剤耐性遺伝子のランダム挿入が示されている程度で、詳細な検討はなされていないのが現状である。

【0013】

ヒト抗体重鎖遺伝子を保持するマウスを作製する目的で単離されたヒト14番染色体由来の自然断片SC20は、マウスでの安定性と生殖系列伝達を確認されている。これにCre/loxPシステムを利用し、相互転座によってMb単位の染色体領域（抗体軽鎖遺伝子を含むヒト2番及び22番染色体領域）をクローニングする方法（染色体クローニング）が確立された（非特許文献18）。この場合も、不要な遺伝子を含まず構造が明らかなHAC構築が目標だが、抗体遺伝子のように他のクローニングベクター（YACなど）の容量を超えた巨大遺伝子への適用で効果が発揮される。

いずれにしても、1) 構造が明らかであり、不要な遺伝子が除去されている、2) 培養細胞、個体で安定に維持される、3) 外来DNAを簡便に導入可能、という条件を満たすHACベクター系は現在までに構築されていない。

【0014】

【非特許文献1】

Pravtchevaら, Genomics (USA), 第30巻, p.529-544, 1995年

【非特許文献2】

Garrickら, Nature Genet. (USA), 第18巻, p.56-59, 1998年

【非特許文献3】

Dobieら, P.N.A.S. (USA), 第93巻, p.6659-6664, 1996年

【非特許文献4】

Alamiら, Hum. Mol. Genet. (UK), 第9巻, p.631-636, 2000年

【非特許文献5】

Ikennoら, Nature Biotech. (USA), 第16巻, p.431-439, 1998年

【非特許文献6】

Tomizukaら, Nature Genet. (USA), 第16巻, p.133-143, 1997年

【非特許文献7】

Tomizukaら, P.N.A.S. (USA), 第97巻, p.722-727, 2000年

【非特許文献8】

Guiducciら, Hum. Mol. Genet. (UK), 第8巻, p.1417-1424, 1999年

【非特許文献9】

Auricheら, EMBO Rep. (UK), 第2巻, p.102-107, 2002年

【非特許文献10】

Auら, Cytogenet. Cell Genet. (スイス), 第86巻, p.194-203, 1999

年

【0015】

【非特許文献11】

Voetら, Genome Res. (USA), 第11巻, p.124-136, 2001年

【非特許文献12】

Itzhakiら, Nature Genet. (USA), 第2巻, p.283-287, 1992年

【非特許文献13】

Kuroiwaら, Nucleic Acids Res. (UK), 第26巻, p.3447-8, 1998年

【非特許文献 1 4】

Millsら, Hum. Mol. Genet. (UK) , 第8巻, p.751-761, 1999年

【非特許文献 1 5】

Hellerら, P.N.A.S. (USA) , 第93巻, p.7125-7130, 1996年

【非特許文献 1 6】

Shenら, Hum. Mol. Genet. (UK) , 第6巻, p.1375-1382, 1997年

【非特許文献 1 7】

Shenら, Curr. Biol. (UK) , 第10巻, p.31-34, 2000年

【非特許文献 1 8】

Kuroiwaら, Nature Biotech. (USA) , 第18巻, p.1086-1090, 2000年

【0 0 1 6】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、細胞中で安定に保持され、大きなサイズの外来遺伝子を簡便に挿入し、細胞に導入することができるヒト人工染色体ベクター及びその作製方法を提供することを目的とする。

【0 0 1 7】

【課題を解決するための手段】

本発明者は上記課題を解決するために、1) 動物細胞を宿主として、余分な遺伝子を含まず安定に保持される染色体ベクターを構築すること、2) 染色体ベクターにクローニングサイトを付与し、目的の遺伝子をクローニングサイトにカセット方式で挿入して発現させる系を構築することを課題として鋭意研究を行った。すなわち、ヒト21番染色体の長腕から既知の遺伝子を削除した改変染色体を得、この改変染色体を保持するDT40雑種細胞の長期継代培養における安定性を確認した後、この改変染色体上の長腕近位にloxP配列とhCMVプロモーターを部位特異的に挿入し、Cre/loxPシステムによりGFP遺伝子を改変染色体に導入したところ、GFPの発現を確認することができた。その結果より、本発明者は、ヒト21番染色体断片に基づいて構築したHACベクターにより上記課題を達成することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0 0 1 8】

すなわち、本発明の概要は以下の通りである。

本発明は、その第1の態様において、長腕遠位及び／又は短腕遠位が削除されたヒト21番染色体断片を含むことを特徴とするヒト人工染色体ベクターを提供する。

本発明の一実施形態において、前記ヒト21番染色体断片のサイズは、約2～16Mbであり、好ましくは約2～6Mbである。

また本発明の一実施形態において、前記ヒト21番染色体の長腕遠位は、例えば21q11領域内で削除され、好ましくはAL163204において削除される。

さらに本発明の一実施形態において、前記ヒト21番染色体の短腕遠位は、例えば21p領域内で削除され、好ましくはAL163201において削除される。

【0019】

さらなる実施形態において、本発明に係るヒト人工染色体ベクターは、前記ヒト21番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位が挿入されている。好ましい実施形態においては、部位特異的組換え酵素の認識部位は、長腕近位のAL163203に挿入されている。また好ましい実施形態においては、部位特異的組換え酵素がCre酵素であり、部位特異的組換え酵素の認識部位がLoxP配列である。

本発明の別の実施形態においては、前記長腕遠位及び／又は短腕遠位の削除が人工テロメア配列との置換によるものである。

【0020】

また本発明は、その第2の態様において、以下のステップを含むヒト人工染色体ベクターの作製方法を提供する：

- (a) ヒト21番染色体を保持する細胞を得るステップ；
- (b) 上記ヒト21番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；並びに
- (c) 上記ヒト21番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ。

【0021】

本発明の一実施形態において、ステップ（a）においては、前記ヒト21番染色体を保持する細胞として相同組換え効率の高いものを用いる。好ましい実施形態においては、相同組換え効率の高い細胞はニワトリDT40細胞由来のものである。

また本発明の一実施形態において、ステップ（b）においては、ヒト21番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位の削除を人工テロメア配列との置換により行う。好ましい実施形態においては、ヒト21番染色体の長腕遠位をAL163204において削除し、短腕遠位をAL163201において削除する。

さらに本発明の一実施形態において、ステップ（c）においては、部位特異的組換え酵素がCre酵素であり、部位特異的組換え酵素の認識部位がLoxP配列である。

さらなる態様において、部位特異的組換え酵素の認識部位は、長腕近位のAL163203に挿入される。

【0022】

さらに本発明は、その第3の態様において、上記作製方法により得られる、ヒト人工染色体ベクターを提供する。

また第4の態様において、本発明は、上記ヒト人工染色体ベクターを保持する細胞を提供する。

【0023】

本発明はさらに、その第5の態様において、上記作製方法において、以下のステップ（d）をさらに含むことを特徴とする、外来DNAを含むヒト人工染色体ベクターの作製方法を提供する：

（d）部位特異的組換え酵素の存在下にてヒト21番染色体に外来DNAを挿入するステップ。

【0024】

また第6の態様において、本発明は、上記作製方法により得られる、外来DNAを含むヒト人工染色体ベクターである。

さらに第7の態様において、本発明は、外来DNAを含むヒト人工染色体ベク

ターを保持する細胞を提供する。

【0025】

また本発明は、その第8の態様において、以下のステップを含む、外来DNAを受容細胞に導入する方法を提供する：

- (a) ヒト21番染色体を保持する供与細胞を得るステップ；
- (b) 上記ヒト21番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；
- (c) 上記ヒト21番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ；
- (d) 部位特異的組換え酵素の存在下にて上記ヒト21番染色体に外来DNAを挿入するステップ；
- (e) 上記ヒト21番染色体を保持する供与細胞からマイクロセルを調製するステップ；
- (f) 上記マイクロセルと受容細胞とを融合するステップ；並びに
- (g) 融合した受容細胞において外来DNAの導入を確認するステップ。

本発明の一実施形態において、上記受容細胞は、動物細胞、好ましくは哺乳動物細胞である。

【0026】

さらに本発明は、その第9の態様において、以下のステップを含む、外来DNAを発現する細胞の作製方法を提供する：

- (a) ヒト21番染色体を保持する供与細胞を得るステップ；
- (b) 上記ヒト21番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；
- (c) 上記ヒト21番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ；
- (d) 部位特異的組換え酵素の発現下にて上記ヒト21番染色体に外来DNAを挿入するステップ；
- (e) 上記ヒト21番染色体を保持する供与細胞からマイクロセルを調製するステップ；

(f) 上記マイクロセルと受容細胞とを融合するステップ；並びに

(g) 融合した受容細胞において外来DNAを発現する細胞を選択するステップ。

本発明の一実施形態において、上記受容細胞は、動物細胞、好ましくは哺乳動物細胞である。

【0027】

またさらに本発明は、その第10の態様において、以下のステップを含む、タンパク質の製造方法を提供する：

(a) ヒト21番染色体を保持する供与細胞を得るステップ；

(b) 上記ヒト21番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；

(c) 上記ヒト21番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ；

(d) 部位特異的組換え酵素の発現下にて上記ヒト21番染色体にタンパク質をコードする外来DNAを挿入するステップ；

(e) 上記ヒト21番染色体を保持する供与細胞からマイクロセルを調製するステップ；

(f) 上記マイクロセルと受容細胞とを融合するステップ；

(g) 融合した受容細胞を培地中で培養するステップ；並びに

(h) 得られる培養物から上記タンパク質を採取するステップ。

【0028】

本発明の一実施形態において、上記タンパク質としては、例えば、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、免疫グロブリン、トロンボポエチン、成長ホルモン、第八因子、インスリン、インターフェロン、インターロイキン2、インターロイキン6、インターロイキン12などが挙げられる。

【0029】

本発明に関わる用語の定義は以下の通りである。

本明細書中、「ヒト人工染色体ベクター」又は「HACベクター」とは、ヒト

染色体に基づいて作製された人工染色体を指す。

また本明細書中、「ヒト染色体」とは、ヒト細胞由来の天然のDNAとタンパク質との複合体を指す。正常なヒト染色体は23種（雄は24種）46本存在し、それぞれ約50～300Mbの長さのDNAを含むことが知られている。また「ヒト染色体断片」とは、独立染色体として安定に複製及び分配が可能な染色体の部分断片を指し、断片の大きさは通常1Mb以上だが、それ以下の場合もある。

【0030】

本明細書中、染色体に関して「長腕」及び「短腕」とは、染色体上のセントロメアの両側の腕（アーム）を指し、その長さに応じて長腕（q）及び短腕（p）と称される。またヒト染色体に関して「長腕遠位」及び「長腕近位」とは、長腕上のセントロメアから遠い位置（すなわちテロメア側）にある領域（遠位）及びセントロメアに近接する領域（近位）を意味する。具体的には、ヒト21番染色体の場合には長腕遠位はAL163204よりもテロメア側、長腕近位はAL163203よりもセントロメア側であり、またヒト14番染色体の場合には長腕遠位はAL132642よりもテロメア側、長腕近位はAL157858よりもセントロメア側である。さらに「短腕遠位」及び「短腕近位」とは、短腕上のセントロメアから遠い位置にある領域（遠位）及びセントロメアに近接する領域（近位）を意味する。具体的には、ヒト21番染色体の場合には短腕遠位及び短腕近位はAL163201において境界があり、またヒト14番染色体の場合にはリボソーマルRNA領域において境界がある。

【0031】

本明細書中、「部位特異的組換え酵素」及び「部位特異的組換え酵素の認識部位」とは、ある酵素が特定の認識部位を認識して特異的にその認識部位でDNAの組換えを起こす現象に関して用いられる用語であり、それぞれその部位特異的に組換えを起こす酵素及び該酵素により認識される部位を指す。

本明細書中、「人工テロメア配列」とは、人工的に付加させたテロメア配列を指す。本発明においては例えばテロメアトランケーションによる人工テロメア配列の付加を行う。

【 0 0 3 2 】

本明細書中、「外来DNA」とは、対象とする細胞にとって外部から導入されるDNAを指し、物質生産及び機能改変又は機能分析などのために発現させることが望まれる遺伝子及びその他の機能配列（例えばプロモーター配列）などをコードするDNAを意味し、同種又は異種のいずれでもよい。

本明細書中、「供与細胞」及び「受容細胞」とは、ヒト人工染色体ベクターを移入又は導入する場合に、最初に該ベクターを保持する細胞（供与細胞）と、供与細胞から該ベクターが移入される細胞（受容細胞）を指す。

【 0 0 3 3 】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、ヒト人工染色体ベクター（以下、「本HACベクター」ともいう）に関するものであり、該HACベクターは、ヒト21番染色体又はヒト14番染色体に基づいて作製され、長腕遠位及び／又は短腕遠位が削除されたヒト21番染色体断片又はヒト14番染色体を含むことを特徴とするものである。

【 0 0 3 4 】

ヒト21番染色体は、セントロメア領域を除く長腕全体及び短腕の一部について塩基配列が公共のデータベース上に公開されている（例えば、<http://hgp.gsc.riken.go.jp/chr21/index.html>（Riken Genomic Sciences Center, Human Genome Research Group）を参照されたい）。このような配列情報を利用することで、後述する人工テロメア配列や10xP配列などを相同組換えによって部位特異的に挿入することが可能となる。また、長腕遠位の削除によって約48Mbの21番染色体が1/3の約16Mbとなり、また長腕遠位及び短腕遠位の削除によって最終的には約2Mbの、既知遺伝子を含まないHACベクターが構築できる。

【 0 0 3 5 】

以前にマウスES細胞へヒト21番染色体を移入し、キメラマウスを作製した実験では、移入した染色体の部分断片が次世代に伝達した。宿主細胞の機能を阻害する遺伝子を含んだ移入染色体領域が排除された結果、安定化したと考えられ

ている (Kazukiら, J. Hum. Genet., 46:600, 2001)。一方ヒト Y 染色体の場合、マウス ES 細胞中では不安定であったが、セントロメアの構成要素であるアルフォイド DNA をマウス染色体から取り込むことによって安定化が起きたと報告されている (Shenら, Hum. Mol. Genet., 6:1375, 1997)。これらのことから、雑種細胞中でのヒト染色体の安定性は染色体毎に異なり、安定性にはセントロメアが関与すると考えられる。先の実験でヒト 21 番染色体のセントロメア (大きさは約 2 Mb と考えられている: Triowellら, Hum. Mol. Genet., 2:1639-1649, 1993; Wangら, Genome Res. 9: 1059-1073, 1999) はマウス細胞/個体中でも機能することが示されているので、セントロメア領域を含むヒト 21 番染色体断片に基づいて作製した本 HAC ベクターは、雑種細胞中で安定に保持されることが期待できる。

【 0 0 3 6 】

また同様に、ヒト 14 番染色体の配列情報に関しても一部について塩基配列が公共のデータベース上に公開されている。さらにヒト 14 番染色体由来の自然断片 (SC20; Tomizukaら, P.N.A.S., 97: 722-727, 2000年; 非特許文献 7) に加工を加えた HAC ベクターにおいてもヒト 21 番染色体の場合と同様の縮小化が可能であると考えられる。SC20 は、ヒト 14 番染色体の長腕遠位及び長腕近位の多くの部分を欠失していることが報告されている (Tomizukaら, P.N.A.S., 97: 722-727, 2000年 (非特許文献 7); 黒岩ら, Nat. Biotech., 1086-1090, 2000 (非特許文献 17))。具体的には、SC20 は、ヒト 14 番染色体長腕のテロメア配列から AL137229 (GenBank 登録番号) を含む領域、およびこれより更にセントロメア側の AL121612 (GenBank 登録番号) から AL157858 (GenBank 登録番号) のテロメア側から 24-26 kb までを含む領域を保持している。また、AL137229 (GenBank 登録番号) と AL121612 (GenBank 登録番号) 間の領域、および AL157858 (GenBank 登録番号) のテロメア側 24-26 kb からセントロメア間の領域を欠失している。一方、ヒト 14 番染色体の短腕領域は保持されている。この SC20 はヒト細胞を含む細胞株やマウス個体において安定に維持され (Shinoharaら, Chromosome Res., 8:713-725, 2000)、SC2

0のリボソーマルRNA領域（ヒト14番染色体短腕部に位置する）にloxP部位を挿入した改変SC20においてもその安定性は保たれていた（黒岩ら、Nat. Biotech., 1086-1090, 2000（非特許文献17））。さらに、それ自身は不安定なヒト22番染色体断片由来の約10Mbの染色体領域を、その改変SC20のloxP部位に転座させたHACもまた、マウスES細胞やマウス個体で安定であった。SC20の問題点は、14番染色体14q32領域の遺伝子を複数含んでいることであるが、本明細書に記載された方法でSC20を縮小化することにより、様々な細胞種で安定に維持され、かつ余分な遺伝子を含まないHACベクターを得ることができる。

【0037】

以下に、本HACベクターの作製、ベクターへの外来DNAの挿入、及び本HACベクターの用途について記載する。

1. ヒト人工染色体（HAC）ベクターの作製

本HACベクターは、上述したようにヒト21番染色体又はヒト14番染色体に基づいて作製する。本HACベクターの作製には、以下の（a）～（c）のステップが含まれる：

- （a）ヒト21番染色体又はヒト14番染色体を保持する細胞を得るステップ；
- （b）上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；並びに
- （c）上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ。

ここで、上記ステップ（b）と（c）の順序は特に限定されない。

【0038】

ステップ（a）：ヒト染色体を保持する細胞の作製

本HACベクターの作製においては、ヒト染色体（例えばヒト21番染色体又はヒト14番染色体）を保持する細胞を用意する。そのような細胞としては、ヒト21番染色体又はヒト14番染色体のみを保持し、かつその後の操作のために相同組換え率の高いものが好ましい。従って本発明においてはまずこれらの条件

を満たすような細胞を作製する。

【0039】

ヒト染色体を保持する細胞は、例えば、ヒト単一染色体を保持する公知のマウスA9雑種細胞ライブラリーからヒト21番染色体又はヒト14番染色体を保持するクローンを選択し、その染色体を相同組換え率の高い細胞に移入することにより作製することができる。マウスA9雑種細胞ライブラリーは、薬剤耐性遺伝子で標識されたヒト単一染色体を保持するものであり、例えば、WO00/10383号、Tanabe, H.ら (Chromosome Res., 8: 319-334, 2000) などに記載されている。またヒト21番染色体及びヒト14番染色体を保持するマウスA9雑種細胞は、Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) にそれぞれ登録番号JCRB2221 (細胞名A9 (Hygro21)) 及びJCRB2214 (細胞名A9 (Hygro14)) として登録されており、その詳細な情報・培養法なども入手可能である。

【0040】

上述のようにして入手したマウスA9雑種細胞に保持されるヒト染色体を、相同組換え率の高い細胞に移入する。ここで「相同組換え率の高い細胞」とは、その細胞において相同組換え操作を行った際に、相同組換えの頻度が高い細胞を指し、そのような細胞としては、例えば、ニワトリDT40細胞 (Diekenら, Nature Genetics, 12:174-182, 1996)、マウスES細胞 (相沢慎一, バイオマニュアルシリーズ8, ジーンターゲットイング, 羊土社, 1995)、などが挙げられる。特に、操作の簡便性などの点から、本発明においてはニワトリDT40細胞を利用することが好ましい。

【0041】

染色体の移入は、当技術分野で公知の染色体移入法に従って行うことができる。例えば、所望の染色体を1本だけ導入する手法として、Koiら (Koiら, Jpn. J. Cancer Res., 80: 413-418, 1973) に記載されているマイクロセル法が挙げられる。この手法は、ある種の細胞において紡錘体形成を阻害する薬剤により誘導されるマイクロセルを分離し、これを受容細胞と融合することにより、少数の染色体を導入するというものである。このマイクロセル法を利用してヒト染色体を移入す

る具体的な操作手順に関しては、例えばWO97/07671号及びWO00/10383号を参照されたい。以上のようにしてヒト21番染色体又はヒト14番染色体を保持する細胞を作製することができる。

【0042】

ステップ(b): ヒト染色体の長腕遠位及び/又は短腕遠位の削除

HACベクターの作製においては、ヒト染色体を保持する細胞において、当該染色体の長腕遠位及び/又は短腕遠位を削除する。染色体の削除は、当技術分野で公知の方法により行うことができ、例えばWO00/10383号に記載されている人工テロメア配列との置換(テロメアトランケーション)により行うことが好ましい。長腕遠位及び/又は短腕遠位を削除するための具体的な手順は、例えば、ヒト染色体を保持する細胞において、人工テロメア配列を保持するターゲティングベクターを構築し、相同組換えにより染色体上の所望の位置に人工テロメア配列の挿入されたクローンを取得した後、テロメア・トランケーションによる欠失変異体を得るというものである(Itzhakiら、Nature Genet., 2:283-287, 1992; 及びBrownら、P.N.A.S., 93:7125, 1996を参照されたい)。ここで染色体の所望の位置とは、削除対象の長腕遠位又は短腕遠位の切断位置であり、この位置に人工テロメア配列が相同組換えにより置換・挿入されて、長腕遠位又は短腕遠位が削除される(テロメアトランケーション)。所望の位置は、ターゲティングベクターを構築する際に標的配列の設計により適宜設定することができ、例えば長腕遠位を削除する場合には、ヒト21番染色体上の21q11領域内、好ましくはAL163204(GenBank登録番号)の塩基配列に基づいて標的配列を設計し、その標的配列よりもテロメア側においてテロメアトランケーションが起こるようにすることによって、標的配列を設定した領域において長腕遠位が切断、削除される(例えば、黒岩ら、Nucleic Acid Research, 26:3447, 1998)。また例えば短腕遠位を削除する場合には、ヒト21番染色体上の21P領域内、好ましくはAL163201(GenBank登録番号)の塩基配列に基づいて標的配列を設計することができる。標的配列の設計は、上述した領域に限定されず、所望のHACベクターを作製するように当業者であれば適宜設計することが可能である。

【0043】

また例えばヒト14番染色体長腕配列をSC20よりもさらに削除する場合、AL157858領域の塩基配列に基づいて標的配列を設計し、その標的配列よりもテロメア側においてテロメアトランケーションが起こるようにすることによって、標的配列を設定した領域において長腕遠位を切断、削除することができる。標的配列の設計は、上述した領域に限定されず、所望のHACベクターを作製するように当業者であれば適宜設計することが可能である。

【0044】

上述のようにして、長腕遠位及び／又は短腕遠位が削除されたヒト染色体断片を形成させ、それを保持する細胞が得られる。このような染色体のサイズの縮小化により、細胞における安定性を達成することができる。また、本HACベクターを保持する細胞、及び後述する本HACベクターが導入される細胞の機能・増殖などに悪影響を与えないように、悪影響を及ぼすと推定される染色体領域を除去することができる。

【0045】

ステップ(c)：部位特異的組換え酵素の認識部位の挿入

本HACベクターの作製においては、ヒト21番染色体又はヒト14番染色体に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入する。このステップ(c)は、上記ステップ(b)の前又は後のいずれで行ってもよく、これらの順番は特に限定されない。すなわち、ヒト21番染色体又はヒト14番染色体において、長腕遠位及び／又は長腕遠位を削除した後で部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入してもよいし、あるいは部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入した後で長腕遠位及び／又は長腕遠位を削除してもよい。

【0046】

当技術分野においては、ある酵素が特定の認識部位を認識して特異的にその認識部位でDNAの組換えを起こす現象が知られており、本発明においてはそのような酵素及び認識部位の系を利用する。例えば、そのような系としては、Cre/loxPシステムが知られている（例えば、Sauer, B.ら, P.N.A.S., 85:5166-5170, 1988を参照されたい）。CreはバクテリオファージP1由来の38K

Dのタンパク質であり、リコンビナーゼのInt（インテグラーゼ）ファミリーに属するものである。この酵素は、約34bpの認識部位loxP配列を認識して、この部位で特異的にDNAの組換えを起こす。またこのloxP配列の方向性によって、2つのloxP配列間のDNAの欠失又は転座が生じることが知られている。またその他の、特異的な配列を認識して組換え反応を起こす系としては、出芽酵母由来のレコンビナーゼFLP（Broachら, Cell, 21:501-508, 1980）、ファージphiC31由来のインテグラーゼ（Thorpeら, P.N.A.S., 95:5505-5510, 1998）などがあり、哺乳動物細胞でもこれらの酵素によるDNA組換え反応が起きることが報告されている（Kochら, Gene, 249:135-144, 2000; Thyagarajanら, Mol. Cell. Biol., 21:3926-3934, 2000）。

【0047】

ヒト染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に、上記部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するには、公知の遺伝子組換え手法、例えば相同組換え法を利用することができる。部位特異的組換え酵素の認識部位の挿入位置は、当業者であれば、必須ではない遺伝子の位置などを考慮して適宜設定することができる。例えば、ヒト21番染色体又はヒト14番染色体の長腕近位又は短腕近位の任意の位置に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入し、その後、後述する外来DNAの導入手法に従ってリポーター遺伝子を導入し、その発現を確認することによって、ヒト染色体上に挿入した認識部位の位置の適否を確認することができる。

【0048】

上記例示した認識部位のうち1種類を1つ又は複数挿入してもよいし、あるいは、異なる系の認識部位を複数挿入してもよい。後述するように、本HACベクターは、部位特異的組換え酵素の認識部位を有するため、外来DNAを部位特異的に導入することが可能であり、さらに、認識部位の設定により外来DNAの導入位置を決定できるため、外来DNAの導入位置が一定となり位置効果（position effect）をうけることもない。また外来DNAの導入操作も簡便となる。さらに異なる系の認識部位を複数挿入することによって、複数の外来DNAを逐次挿入することもできる。

【0049】

上述のようにしてヒト染色体を改変して作製した本HACベクターには、部位特異的組換え酵素の認識部位の他、プロモーター、薬剤耐性遺伝子などのベクター構築において一般的に挿入される配列又はエレメントが挿入されていてもよい。そのような配列又はエレメントは、上述したように相同組換え法を利用して本HACベクターの所望の位置に挿入することができる。

【0050】

さらに本発明者は、上述のように作製した本HACベクター（ヒト21番染色体又はヒト14番染色体）を保持する細胞を、選択薬剤を含まない培地で長期にわたり継代培養し、経時的にHACベクターの保持率をFISH法により検定したところ、本HACベクターは宿主細胞（例えばDT40細胞及びCHO細胞）において安定に保持されることを確認することができた。

【0051】

2. HACベクターへの外来DNAの導入（ステップ（d））

上記HACベクターの作製において、部位特異的組換え酵素の存在下にて外来DNAを挿入するステップ（d）を行うことにより、本HACベクターに外来DNAを導入することができる。このステップ（d）は、上述したステップ（c）の後に行うものであるが、ステップ（b）との順序は特に限定されず、ステップ（b）の前又は後に行うことができる。従って、ステップ（b）～（d）の順序は明細書に記載する順序に限定されないことに留意されたい。

【0052】

外来DNAとは、対象とする細胞にとって外部から導入されるDNAを指し、遺伝子及びその他の機能配列などをコードするDNAである。本発明において導入対象となる外来DNAとしては、物質生産及び機能改変又は機能分析などのために発現させることが望まれる遺伝子及びその他の機能配列などをコードするDNAであれば特に限定されない。その他の機能配列とは、遺伝子が発現するために機能する配列を指し、例えば、プロモーター、エンハンサー、シグナル配列などが挙げられる。

【0053】

外来DNAの導入は、上記挿入されている部位特異的組換え酵素の系を利用し

て行う。例えば、Cre 酵素の認識部位である loxP 配列と外来 DNA を保持するターゲティングベクターを構築する。続いて本 HAC ベクター（ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体）を保持する細胞において、Cre 酵素を細胞内で発現させることにより、loxP 配列と人工テロメア配列に挟まれた領域と、上記ターゲティングベクターとの部位特異的組換えにより、外来 DNA を本 HAC ベクター上に挿入させることができる（黒岩ら, Nature Biotech., 18:1086, 2000）。

【0054】

本 HAC ベクターには、部位特異的組換え酵素の認識部位（loxP 配列）を保持する環状 DNA が挿入できる。このため大腸菌を宿主としたプラスミド、BAC、PAC や、酵母を宿主とした環状 YAC など既存のベクターによりクローン化された DNA を挿入することができる。またヒト染色体に基づいて作製されていることから、本 HAC ベクターに導入可能な外来 DNA のサイズの上限は 100 kb オーダーまで拡張され、従来発現実験に用いられてきたプラスミドベクターに組み込まれた cDNA だけではなく、遺伝子の発現制御領域を含むゲノム DNA も導入可能である。

【0055】

例えば、本 HAC ベクターに外来 DNA を挿入して構築された、外来 DNA を含む HAC ベクターは、その挿入によって安定構造が変化する可能性、さらに外来 DNA を含む HAC ベクター全体の大きさが不利に大きくなる可能性も考えられるので、導入（挿入）する外来 DNA の大きさは、通常約 10 Mb ～約 1 kb、好ましくは約 3 Mb ～約 2 kb、さらに好ましくは約 1 Mb ～約 3 kb とする。

【0056】

従来の cDNA 強制発現ベクターを用いた遺伝子導入法では、過剰発現による細胞毒性や増殖抑制などの副作用が生じ、導入遺伝子を恒常的に発現する細胞株が得られない例が多い。この問題点を克服し、生理的な発現パターンを保ちながらなおかつ発現を人工的に制御するには、テトラサイクリンなどを利用した遺伝子発現誘導系の適用が望ましい。導入可能なインサートサイズが大きく、一定の

コピー数が安定に保持されるという本HACベクターの特徴はこのような目的に適っている。

【0057】

組織特異的／生理的な遺伝子発現は、遺伝子をコードするゲノム領域からの転写、転写産物の編集、核外への輸送、翻訳の各段階で制御を受ける。一つの遺伝子に対して複数のプロモーターがあって転写開始点が異なったり、スプライシングにバリエーションが生じることで、組織特異的なアイソフォームが発現することが知られている。クローン化cDNAは一つの遺伝子に由来する複数の転写産物バリエーションの1つにすぎない。生理的な遺伝子発現を再現するためには、ゲノムDNAとして制御配列を含んだ遺伝子領域を導入することが望ましい。本HACベクターの利用はこのような目的に適うものである。

【0058】

ヒト21番染色体断片を保持するマウスES細胞からキメラ個体を作製したところ、次世代伝達が確認されたことから、ヒト21番染色体のセントロメアはマウス細胞及び個体中で複製分配保持されると考えられる (Kazukiら, J. Hum. Genet., 46:600, 2001)。そのため、本HACベクターもまたマウス個体中で安定に保持される可能性が高い。

【0059】

ヒトゲノムプロジェクトでは、ゲノムDNAはBACクローンとして単離され、塩基配列が決定された。このため公開されているデータベース (GenBank など) では、塩基配列はBAC単位でも登録されている。遺伝子機能解析の1手段としてトランスジェニックマウスの作製がある。本HACベクターをプラットフォームとしてBACを挿入することで、位置効果を受けることなく常に同一条件で遺伝子の発現を解析することが可能になる。多くのBACベクターはloxP配列を保持しているため、本HACベクターへの挿入をネガティブ選別する系を用いれば、塩基配列既知のBACを本HACベクターにカセット形式で簡単に挿入できると考えられる。

【0060】

上述した以外にも、本HACベクターへの外来DNAの導入手法及び導入の利

点があり、以下にそのいくつかを例示する。

(1) 相互転座による染色体部分断片の導入

C r e 酵素による l o x P 配列間の部位特異的組換えは、線状染色体と環状インサート（外来DNA）の場合は挿入反応が起こるが、線状染色体同士では相互転座の反応が起きる。これを利用すれば環状インサートにクローニングできない Mb 単位以上の染色体断片を本 H A C ベクターに導入することができる（Kuroiwa ら, Gene Ther. 9:708, 2002）。

【0061】

(2) 挿入体選別法

本明細書の実施例に記載する方法においては、本 H A C ベクターへの外来DNAの挿入は、薬剤耐性遺伝子の再構成を指標としたポジティブ選別を利用している（組換え体のポジティブ選別に関しては、WO 00/10383号を参照されたい）。これに代わって、チミジンキナーゼ／ガンシクロビル系などのネガティブ選別により、インサート挿入体（外来DNAが挿入されたもの）を得ることも可能である。この場合、挿入する環状DNAには l o x P 配列のみが含まれていればよい。ゲノムプロジェクトで用いられた B A C ライブラリーは l o x P 配列を含んでいるので、このようなネガティブ選別の系が確立できれば配列既知のゲノムクローンを本 H A C ベクターに容易に挿入することが可能になる。

【0062】

(3) 複数インサートの挿入

本発明において好ましく用いられる l o x P 配列は P 1 フェージに由来する野生型の配列であり、C r e 酵素による H A C ベクター上の l o x P 配列への環状インサートの挿入反応は可逆的である。本明細書に記載する実施例においては、C r e 酵素を一過性に発現させ、薬剤耐性の獲得を指標に部位特異的な組換え体を選別することにより構成的な挿入体を得られた。一度環状インサートが挿入されると、H A C ベクター上に2つの l o x P 配列が残る。このため再度 C r e 酵素を発現させると逆反応（環状インサートの切り出し）が起きる可能性もあり、二次的にインサートを挿入するなどのさらなる H A C ベクターの改変は困難となる。一方、塩基置換を行った変異 l o x P 配列の組み合わせによっては、反応方

向及び反応の特異性を限定できるとの報告がある (Hoessら, Nucleic Acids Res., 14:1986; Arakiら, Nucleic Acids Res., 25:868, 1997; Leeら, Gene, 216:55, 1998)。このような変異 $10 \times P$ 配列を用いることで、上述した逆反応を起こさず、複数の環状インサートを逐次挿入する系も構築可能である。

【0063】

3. HACベクターの細胞への移入

本HACベクター又は外来DNAを含む本HACベクターを保持する細胞から、それらのベクターをその他の細胞へ移入することができる。移入先となる細胞は、特に限定されるものではないが、動物細胞（哺乳動物細胞）などが挙げられる。本発明においては、無傷の状態でヒト染色体を移入可能であることが知られているチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いることが好ましい（WO00/10383号参照）。CHO細胞は、効率良くマイクロセルを形成することが知られており（例えば、Koiら、SCIENCE 260:361, 1993）、これにより本HACベクターをCHO細胞からさらに別の細胞（CHO細胞以外の細胞）へ移入することも可能である。

【0064】

HACベクターの細胞への移入は、マイクロセル法を利用して行うことができる。マイクロセル法は、上記「1. ヒト人工染色体（HAC）ベクターの作製」の項に記載のように行うことができる。

また、本HACベクターの細胞への移入について、最初に用意したヒト染色体を保持する細胞から、ヒト染色体への改変を行うステップの前、ステップの間、又はステップの後のいずれの段階においてもヒト染色体（HACベクター）を他の細胞へ移入することが可能である。

【0065】

4. HACベクターの用途

本発明の目的は、ベクターという基本ツールとその利用技術の提供であり、学術研究から産業に至る非常に幅広い領域に波及効果をもたらすことが期待される。①宿主染色体に挿入されず独立して維持される（宿主遺伝子の変異やがん化の懸念がない）、②一定のコピー数で長期間安定に保持される（過剰発現、発現消

失の懸念がない)、③導入可能なDNAの長さの制限がない(正常な発現制御を
保証するDNAエレメントを含む遺伝子や複数遺伝子を同時に導入可能である)
、という本HACベクターの特徴は、従来のベクターで不可能であった多くのこ
とを可能にすると想像される。本HACベクターの用途としては、限定するもの
ではないが主要なものを挙げると、①動物培養細胞における遺伝子機能解析用ベ
クター、②ヒト疾患遺伝子治療用ベクター、③ヒト臓器幹細胞、胚幹細胞(ES
細胞)への遺伝子導入用ベクター、④遺伝子導入動物作製用ベクター(例:ヒト
疾患モデル動物作製、KO動物と組み合わせた特定遺伝子のヒト化)、などが考
えられる。以下に、本HACベクターの用途の一例として、外来DNAの受容細
胞への導入、外来DNAを発現する細胞の作製、及びタンパク質の製造を説明す
る。

【0066】

(1) 外来DNAの受容細胞への導入

本HACベクターは、細胞中で外来DNAを挿入したり、外来DNAが挿入さ
れたHACベクターを他の細胞に移入したりできるため、外来DNAを所望の受
容細胞に導入することができる。外来DNAの受容細胞への導入には、例えば以
下のステップが含まれる:

(a) ヒト21番染色体又はヒト14番染色体を保持する供与細胞を得るステ
ップ;

(b) 上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体の長腕遠位及び/又は短腕
遠位を削除するステップ;

(c) 上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体の長腕近位及び/又は短腕
近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ;

(d) 部位特異的組換え酵素の存在下にて上記ヒト21番染色体又はヒト14
番染色体に外来DNAを挿入するステップ;

(e) 上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体を保持する供与細胞からミ
クロセルを調製するステップ;

(f) 上記マイクロセルと受容細胞とを融合するステップ;並びに

(g) 融合した受容細胞において外来DNAの導入を確認するステップ。

ステップ (a) ~ (d) は、上述したように行うことができ、ステップを行う順序はこれに限定されない。

【0067】

ステップ (e) 及び (f) においては、ヒト染色体を保持する供与細胞から、マイクロセル法を利用して受容細胞に当該染色体断片を移入する。移入対象となるヒト染色体は、ステップ (b) ~ (d) における染色体の改変前、改変ステップの途中、又は改変後のものとすることができる。従って、例えばステップ (d) においてヒト染色体に外来DNAを挿入する前に、ヒト染色体を保持する供与細胞から、マイクロセル法を利用して受容細胞に当該染色体を移入してもよい。その後、ステップ (d) の外来DNAの挿入操作を受容細胞において行って、外来DNAが挿入されたヒト染色体を受容細胞に保持させることもできる。これらのステップは他の順序で行うこともでき、ステップ (d) ~ (f) の順序は、上記順序に限定されない。

【0068】

マイクロセル法は、上記「1. ヒト人工染色体 (HAC) ベクターの作製」の項に記載のように行うことができる。ここで用いる受容細胞は、特に限定されるものではないが、動物細胞、特に哺乳動物細胞（例えばマウス細胞、ヒト細胞など）が好ましい。

続いて、ステップ (g) においては、受容細胞に外来DNAが導入（移入）されているか否かを確認する。この確認は、当技術分野で公知の手法により行うことができ、例えば、外来DNAの制限酵素部位に対応するプローブを用いたサザンブロット解析などにより、外来DNAの導入を確認することができる。

本HACベクターを用いることにより、大きなサイズの外来DNAを細胞に導入し、安定に保持させることが可能となる。

【0069】

(2) 外来DNAを発現する細胞の作製

本HACベクターは、上述したように、細胞中で外来DNAを挿入したり、外来DNAが挿入されたHACベクターを他の細胞に移入したりできるため、外来DNAを発現する細胞を作製することもできる。外来DNAを発現する細胞の作

製には、例えば以下のステップが含まれる：

- (a) ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体を保持する供与細胞を得るステップ；
- (b) 上記ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；
- (c) 上記ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ；
- (d) 部位特異的組換え酵素の発現下にて上記ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体に外来 DNA を挿入するステップ；
- (e) 上記ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体を保持する供与細胞からミクロセルを調製するステップ；
- (f) 上記ミクロセルと受容細胞とを融合するステップ；並びに
- (g) 融合した受容細胞において外来 DNA を発現する細胞を選択するステップ。

ステップ (a) ～ (f) は、上述したように行うことができ、ステップを行う順序はこれに限定されない。

【0070】

ステップ (g) においては、受容細胞において外来 DNA の発現を確認し、外来 DNA を発現する細胞を選択する。外来 DNA の発現の確認は、当技術分野で公知の手法により行うことができ、例えば、外来 DNA に対応するプローブを用いたノーザン・ブロット法などが挙げられる。

本 HAC ベクターを用いることにより、大きなサイズの外来 DNA を発現する細胞を作製することが可能となる。

【0071】

(3) タンパク質の製造

本 HAC ベクターを利用することにより、上述したように、外来 DNA を細胞に導入したり、外来 DNA を発現する細胞を作製することができるため、当該外来 DNA によりコードされるタンパク質を製造することができる。タンパク質の製造には、例えば以下のステップが含まれる：

- (a) ヒト 21 番染色体を保持する供与細胞を得るステップ；
 - (b) 上記ヒト 21 番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；
 - (c) 上記ヒト 21 番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ；
 - (d) 部位特異的組換え酵素の発現下にて上記ヒト 21 番染色体にタンパク質をコードする外来 DNA を挿入するステップ；
 - (e) 上記ヒト 21 番染色体を保持する供与細胞からマイクロセルを調製するステップ；
 - (f) 上記マイクロセルと受容細胞とを融合するステップ；
 - (g) 融合した受容細胞を培地中で培養するステップ；並びに
 - (h) 得られる培養物から上記タンパク質を採取するステップ。
- ステップ (a) ～ (f) は、上述したように行うことができ、ステップを行う順序はこれに限定されない。

【0072】

ステップ (g) では、ステップ (f) で融合した受容細胞を培地中で培養する。受容細胞を培養するための培地は、炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、上記受容細胞の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよく、当業者であれば適切な培地を選択し、また必要により適宜修正を加えて培地を調製することができる。また、振盪培養又は通気攪拌培養等の好氣的条件、温度、pH、培養期間なども適宜設定する。

【0073】

培養後、ステップ (h) に記載するように、得られる培養物からタンパク質を採取する。「培養物」とは、培養上清のほか、培養細胞又は細胞の破碎物のいずれをも意味するものである。培養終了後、該培養物よりタンパク質を採取するには、通常のタンパク質精製手段等を用いて得ることが出来る。例えば、細胞内に生産された場合は、常法により細胞を超音波破壊処理、磨砕処理、加圧破碎等によりタンパク質を抽出する。必要に応じてプロテアーゼ阻害剤を添加する。また、培養上清に生産された場合は、培養液そのものを用いることが出来る。そして

、この溶液を濾過、遠心分離等を行い固形部分を除去し、必要によりプロトタミン処理等により核酸を除去する。

【0074】

次いで、これに硫酸、アルコール、アセトン等を添加して分画し、沈殿物を採取し、粗タンパク質溶液を得る。該タンパク質溶液を各種クロマトグラフィー、電気泳動等にかけて精製酵素標品を得る。例えば、セファデックス、ウルトロゲル若しくはバイオゲル等を用いるゲル濾過、イオン交換体クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル等を用いる電気泳動法、アフィニティクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等を用いる分画法を適宜選択し、又はこれらを組み合わせることにより、精製された目的のタンパク質を得ることが出来る。しかし、上記培養法、精製法は一例であって、これに限定されるものではない。

【0075】

本発明において、製造対象となるタンパク質は、製造が望まれるタンパク質であれば特に限定されるものではないが、一例としては、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、免疫グロブリン、トロンボポエチン、成長ホルモン、第八因子、インスリン、インターフェロン、インターロイキン2、インターロイキン6、インターロイキン12などが挙げられる。このような製造対象のタンパク質をコードする遺伝子（すなわち外来DNA）は、例えば公の遺伝子データベースなどを利用してその配列情報を入手することができる。

【0076】

【実施例】

本発明を以下の実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

〔実施例1〕 ヒト21番染色体長腕遠位の削除によるHACベクターの作製

(1) テロメア短縮のためのコンストラクト構築

ヒト21番染色体の長腕遠位を削除するためのテロメアトランケーションベクター（ターゲティングベクター）は、PBS-TEL/Puro (Kuroiwa, Nucleic Acids Res., 26:3447, 1998) を用いた。GenBankデータベースより

得たヒト21番染色体長腕遠位の塩基配列（登録番号AL163204）から、テロメアトランケーションベクター挿入の標的配列を設計した。これをPCR増幅するための、制限酵素BamHIの認識配列を付加したプライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す：

#21telF1: 5'-CGCGGATCCAGAGAGAGCCTGGAATGCCTGGTAGTGT（配列番号1）

#21telR1: 5'-CGCGGATCCCCAGTGCCCTGAGATCTTGTGATTTCTC（配列番号2）

【0077】

ヒト21番染色体を保持するDT40雑種細胞は、同染色体を保持するマウスA9雑種細胞（Shinohara, Hum Mol Genet, 10: 1163, 2001）を染色体供与細胞としてマイクロセル法により調製した。染色体受容細胞であるDT40はJapanese Collection of Research Bioresources（JCRB）に登録番号JCRB2221として登録されており、入手可能である。以下に調製法の概略を記す。

【0078】

はじめに約 1×10^8 個のA9（#21neo）細胞からマイクロセルを調製した。25cm²遠心用フラスコ（コースター）12本に細胞密度が60～70%飽和程度まで培養したA9（#21neo）細胞をコルセミド（0.05μg/ml, デメコルシン, 和光純薬）を含む培養液（10% CS, 0.05μg/ml G418, DMEM）中で72時間培養して微小核を誘導した。実施例において、DMEMはインビトロジェン製のものをを用いた。培地を除いた後、予め保温（34℃）しておいたサイトカラシンB（DMEM中に10μg/ml, シグマ）溶液を遠心用フラスコに満たし、アクリル性遠心容器に遠心用フラスコを挿入し、34℃, 8000rpm, 1時間の遠心を行った。マイクロセルを無血清培地（DMEM, シグマ）に懸濁して回収し、フィルターで濾過して精製した。精製したマイクロセルは10μg/mlのフィトヘムアグルチニンP（Phytohemagglutinin-P, シグマ）を含むDMEM4mlに再懸濁した。DT40細胞は、50μg/mlのポリLリジン（Poly-L-Lysine, シグマ）でコーティングした6穴クラスター（ヌンク）の2穴に 1×10^8 個を播種した後1時間静置し、あらかじめ底面に付着させておく。これにマイクロセル懸濁液を加え3分間静置したのち上清を除き、50%（w/v）ポリエチレングリコール1500（ロッシュ

ダイアグノスティクス) で1分間処理した。融合細胞を無血清DMEM 12 ml に懸濁し、6穴プレートの4穴に播いて24時間培養した後、 $1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のG418を含む培地で約2週間選択培養し、出現した薬剤耐性のコロニーを単離した。

【0079】

上記DT40雑種細胞を培養し、細胞からPuregene DNA Isolation kit (Gentra System社) を用いてゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを鋳型とし、上記のプライマーを用いて組換えの標的配列をPCR法により増幅した。鋳型として約 $0.1 \mu\text{g}$ のゲノムDNAを使用し、Innisら (PCR実験マニュアル, HBJ出版局, 1991) に従い、サーマルサイクラーはGeneAmp9700 (Applied Biosystems社) を使用してPCRを行った。TaqポリメラーゼはLA Taq (宝酒造) を用い、反応条件は、 95°C 2分の後、変性 95°C 30秒、アニーリング/伸長 68°C 6分を35サイクル行った。増幅産物を制限酵素BamHI (ニッポンジーン) で消化して、突出末端をもつ約5 kbのDNA断片をアガロースゲル電気泳動により分離し、精製した。これをPBS-TEL/PuroプラスミドのBamHIサイトにクローニングした。最終的なPBS-TEL/Puroコンストラクトのサイズは約10.6 kbである。テロメアトランケーションベクター、標的配列、及び相同組換えにより生じる染色体アレルを図1に示した。

【0080】

(2) トランスフェクション及びpuro耐性クローンの単離

PBS-TEL/Puroコンストラクトを制限酵素EcoRI消化により線状化DNAとし、ヒト21番染色体を保持するDT40雑種細胞に導入した。DT40雑種細胞 1×10^7 を0.75 mlのPBSに懸濁し、 $25 \mu\text{g}$ DNA存在下でジーンパルサー (バイオラッド) を用いてエレクトロポレーションを行った。容量 $25 \mu\text{F}$ のコンデンサに750 Vで印加し電極間距離4 mmのエレクトロポレーションセルを用いて放電した。エレクトロポレーションした細胞を、10%牛胎仔血清 (FBS)、1%ニワトリ血清 (ChS) 及び $50 \mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノールを添加したDMEM培地 (インビトロジェン製) に懸濁し、96穴クラスター (ファルコン) 2枚に播種した。2日後に終濃度 $0.3 \mu\text{g}/$

m1となるようピューロマイシン (Puromycin dihydrochloride, シグマ) を加えた。2～3週間後には耐性コロニーが出現し、その頻度はDT40雑種細胞 1×10^7 あたり平均17.8個であった。20回のトランスフェクションから合計356の薬剤耐性コロニーを単離して増殖させ、以後の解析を行った。

【0081】

(3) 相同組換え体の選別とテロメア短縮の確認

(3-1) PCR解析

ピューロマイシン耐性株ゲノムDNAを鋳型としてヒト21番染色体上に存在する遺伝子及びSTSマーカー (D21S265, CBR, SIM2, D21S268, D21S266, D21S1259) の存在をPCR法により検出した。

【0082】

これらのSTSマーカーのプライマーオリゴヌクレオチドの配列は米国National Center for Biotechnology InformationのオンラインデータベースUniSTS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unists>) において閲覧可能である。上記6種のSTSマーカーの登録番号は順にUniSTS: 76223, 45641, 54124, 22625, 54266, 53746である。その他にGenBankデータベースより入手した塩基配列をもとに設計した遺伝子プライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す:

PRED65F: 5'- GCCTGGCATCTTCCTCAATA (配列番号3)

PRED65R: 5'- TTGCATGCCTGTGGTACTGT (配列番号4)

PRED3F: 5'- TCACAATCATGGGCTTTGAA (配列番号5)

PRED3R: 5'- CACGCAACCATTTGTTTCATT (配列番号6)

【0083】

約0.1 μ gのゲノムDNAを鋳型として、はじめに上記8種のうち相同組換えによる切断部位の近位に位置するPRED3遺伝子と、遠位に位置するD21S265マーカー及びD21S266マーカーの計3種についてPCR増幅 (Innisら, 前記) を行った。テロメアトランケーションにより長腕遠位が削除された場合、PRED3遺伝子を保持しD21S265マーカー及びD21S266

マーカーを保持しないことが予想される。耐性 354 クローンのうち 24 クローンにおいて予想される増幅結果が得られた。これら 24 クローンについては残る 7 種のマーカーによる PCR 増幅を行い、ヒト 21 番染色体の保持領域を確認した。以上の代表的な結果を図 2 に示す。図 2 には、左側にヒト 21 番染色体の G バンド像に基づく模式的な染色体地図を、またマーカーについてはどのバンドに位置するかを示した。3 種のピューロマイシン耐性 DT40 株について、PCR により期待される増幅産物が検出されたマーカーは■で、検出されなかったマーカーを□で示した。DT40 (#21) は、テロメアトランケーションを行う前の細胞である。

【0084】

(3-2) サザンプロット解析

相同組換えの標的配列内にプローブを設定した(図1)。プローブは以下に示すオリゴヌクレオチドプライマー対を用い、ヒト 21 番染色体を保持する DT40 雑種細胞のゲノム DNA を鋳型として PCR により増幅し、その後 PCR 増幅断片を単離及び精製した。

21LOX4869F: 5' - GTTGCAGAAAAGTAGACTGTAGCAA (配列番号 7)

21LOX5682R: 5' - TCTAAGGAACAAATCTAGGTCATGG (配列番号 8)

【0085】

1 次スクリーニングで得た 24 クローンから抽出したゲノム DNA 約 10 μ g を制限酵素 Kpn I (宝酒造) により消化し、Ausubel ら (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994) に記された方法でサザンプロット解析を行った。³²P により標識したプローブがハイブリダイズしたシグナルを、イメージアナライザー BAS2000 (富士写真フィルム) により検出した。代表的な結果を図 3 に示す。塩基配列から予想される制限酵素断片長は相同組換え体で 13.6 kb、野生型 (非組換え体) で 9.0 kb であり、候補クローン 24 のうち、2 クローンが相同組換え体であることを確認した。

【0086】

(3-3) 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH)

FISH 解析は、松原ら (FISH 実験プロトコル, 秀潤社, 1994) に記さ

れた方法に従い、ヒト特異的プローブC o t 1 (ギブコB R L) を用いて行った。その結果、観察した分裂像のほとんどにおいて短縮したヒト21番染色体が検出された。代表的なF I S H像を図4に示す。図4においてaの白矢印はテロメアトランケーションを行う前の全長のヒト21番染色体を、bの白矢印は長腕遠位を削除したヒト21番染色体断片を示している。宿主であるD T 4 0細胞の染色体との相対的な大きさから、ヒト21番染色体が短縮したことが確認された。

以上の実験より、得られたピューロマイシン耐性の2株が長腕削除により短縮したヒト21番染色体を保持することが確かめられた。

【0087】

【実施例2】H A Cベクターにおけるヒト21番染色体長腕近位へのl o x P配列の挿入

(1) l o x P挿入のためのコンストラクト構築

実施例1で作製したヒト人工染色体(H A C)にl o x P配列を挿入するための基本プラスミドには、p S F 1 (ライフテック)を用いた。L o x P挿入部位であるヒト21番染色体長腕近位の塩基配列はG e n B a n kデータベースより得た(登録番号A L 1 6 3 2 0 3)。相同組換えの2つの標的配列の増幅に用いたプライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す:

#21qEcoF: 5'- CCGGAATTCCTCTGGGTTTCTGGTGAAGC (配列番号9)

#21qEcoR: 5'- CCGGAATTCTGTAGATCCTGCCATTGTGG (配列番号10)

#21qBaF: 5'- CGCGGATCCTTGGCTCCAAAAGGTACCAC (配列番号11)

#21qBaR: 5'- CGCGGATCCCTATCCTCGCCACTGTGTCC (配列番号12)

【0088】

ヒト21番染色体を保持するD T 4 0雑種細胞から抽出したゲノムDNAを鋳型として2つの標的配列をP C Rにより増幅した。それぞれを制限酵素E c o R I (ニッポンジーン) ないしB a m H I (ニッポンジーン) で消化して、突出末端をもつ約3 k bのDNA断片をアガロースゲル電気泳動により分離し、精製した。これらをp S F 1プラスミドのE c o R IないしB a m H Iサイトにクローニングした。相同組換え体の選別に用いるプラスミド耐性遺伝子は、p C M V / B s d (インビトロジェン) より制限酵素X h o I (ニッポンジーン) 及

び S a l I (ニッポンジーン) 消化により約 1.3 kb の断片として切り出し、上記 p S F 1 コンストラクトの X h o I サイトにクローニングした。

最終的な p S F 1 コンストラクトのサイズは約 12.4 kb である。ターゲティングベクター、標的配列、及び相同組換えにより生じる染色体アレルを図 5 に示した。

【0089】

(2) トランスフェクション及び b s r 耐性クローンの単離

p S F 1 コンストラクトを制限酵素 A p a I (ニッポンジーン) 消化により線状化し、長腕遠位を削除したヒト 21 番染色体を保持する D T 4 0 株 (D T 4 0 (# 2 1) p u r o - 3 3 9) に導入した。D T 4 0 雑種細胞を 1×10^7 を 0.75 ml の P B S に懸濁し、 $10 \mu\text{g}$ DNA 存在下でジーンパルサー (バイオラッド) を用いてエレクトロポレーションを行った。容量 $25 \mu\text{F}$ のコンデンサに 750 V で印加し、電極間距離 4 mm のエレクトロポレーションセルを用いて放電した。エレクトロポレーションした細胞を 10% 牛胎仔血清 (F B S)、1% ニワトリ血清 (C h S)、 $50 \mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノールを添加した D M E M 培地 (インビトロジェン製) に懸濁し、96 穴クラスター (ファルコン) 3 枚に播種した。2 日後に終濃度 $8 \mu\text{g/ml}$ となるようブラストサイジン (Blasticidin S Hydrochloride、フナコシ) を加えた。2~3 週間後には耐性コロニーが出現し、その頻度は D T 4 0 雑種細胞 1×10^7 あたり平均 5.8 個であった。14 回のトランスフェクションで得た計 82 のコロニーを単離して増殖させ、以後の解析を行った。

【0090】

(3) 相同組み換え体の選別

(3-1) サザンブロット解析

相同組換え体を選別するためのスクリーニングとしてサザンブロット解析を行った。相同組換えの標的配列の外側にプローブを設定した。プローブは次に記すオリゴヌクレオチドプライマー対を用い、ヒト 21 番染色体を保持する D T 4 0 雑種細胞のゲノム DNA を鋳型として P C R により増幅、単離、精製した。

21LOX4869F: 5' - GTTGCAGAAAAGTAGACTGTAGCAA (配列番号 13)

21LOX5682R: 5'- TCTAAGGAACAAATCTAGGTCATGG (配列番号 14)

【0091】

ブラストサイジン耐性クローンから抽出したゲノムDNA約10 μ gを制限酵素XbaI (ニッポンジーン) により消化し、サザンブロット解析を行った(図6)。プローブは³²Pにより標識し、シグナルはイメージアナライザーBAS2000 (富士写真フィルム) により検出した。図6Aにおいて左から1番目のレーンはloxPサイトを導入する前のヒト21番染色体を保持するDT40株、2番目のレーンは宿主のDT40細胞株、3番目以降のレーンはブラストサイジン耐性DT40株を示す。塩基配列から予想される制限酵素断片長は相同組換え体で7.6 kb、野生型(非組換え体)で8.5 kbであり、ブラストサイジン耐性株82から合計3クローン(#60, #78, #79)の相同組換え体を見出した。

【0092】

(3-2) PCR解析

左右2つの標的配列(図5中、それぞれA及びBで示す)に対し、これらを夾んで染色体上とターゲティングベクター上にそれぞれオリゴヌクレオチドプライマー対を設計した。その位置は図5中に矢印で示した。その配列を以下に示す:

Left455F: 5'- GGGCTAGCCATTAAAGCTGA (配列番号 15)

Left638R: 5'- AAAGGGAATAAGGGCGACAC (配列番号 16)

Right958F: 5'- GGTTTGTCCAAACTCATCAATGTA (配列番号 17)

Right1152R: 5'- GTCAATTCACCTAATTCCTATTCCTCAGT (配列番号 18)

【0093】

サザンブロット解析により見出した候補クローンからゲノムDNAを抽出してPCRを行い、塩基配列から予想されるサイズ(左側(A) 3,283 bp及び右側(B) 3,114 bp)の増幅産物を与えることを確認した。結果を図6Bに示す。

以上の(1)～(3)の実験により、得られたブラストサイジン耐性DT40細胞82株のうち3株が、相同組換えによりloxP配列が挿入されたヒト21番染色体部分断片(HACベクター)を保持することが確かめられた。

【0094】

〔実施例3〕ヒト21番染色体由来HACベクターのハムスター細胞株への移入

(1) 微小核細胞融合と薬剤耐性クローンの単離

染色体供与細胞として、実施例1及び2で得られた、長腕遠位を削除して10xP配列を挿入したヒト21番染色体に基づくHACベクターを保持するDT40細胞(DT40(#21)bsd-79)を用いた。染色体受容細胞としてはチャイニーズハムスター由来細胞株CHO-K1(ATCCより入手、登録番号JCRB9018)を用いた。

【0095】

はじめに約 10^9 個のDT40(#21)bsd-79細胞からマイクロセルを調製した。細胞密度が60~70%飽和程度まで培養したDT40(#21)bsd-79細胞をコルセミド($0.075\mu\text{g}/\text{ml}$, デメコルシン, 和光純薬)を含む培養液(10%FBS, 1%ChS, $50\mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノール, DMEM)中で12~15時間培養して微小核を誘導した。遠心分離により細胞を回収して無血清DMEMに再懸濁し、予めポリ-L-リジンでコーティングした 25cm^2 遠心用フラスコ(コースター)12本に播種した。37℃1時間静置することで細胞が付着したのち培養液を除去し、予め保温(37℃)しておいたサイトカラシンB(DMEM中に $10\mu\text{g}/\text{ml}$, シグマ)溶液を遠心用フラスコに満たし、アクリル性遠心容器に遠心用フラスコを挿入し、34℃、8,000rpm、1時間の遠心を行った。マイクロセルを無血清培地(DMEM)に懸濁して回収し、フィルターで濾過して精製した。CHO-K1細胞を80%飽和の状態まで培養した6cm径ディッシュに精製した微小核細胞を加えPEG溶液で融合した。48時間後にトリプシン処理により細胞を分散し、ブラストサイジン($8\mu\text{g}/\text{ml}$)を含む選択培地(10%FBS, F12)で培養した。約2週間の選択培養の後、出現した薬剤耐性のコロニーを単離し、以後の解析を行った。12回の微小核細胞融合から計4株のブラストサイジン耐性CHO株を得た。

【0096】

(2) 移入染色体の確認

(2-1) PCR法

移入染色体の確認をPCR法により行った。ヒト21番染色体長腕近位のマーカーPRE D 6 5及びPRE D 3遺伝子(実施例1の(3)参照)の検出を試みた。プラストサイジン耐性のCHO細胞4株のすべてにおいて、2種のマーカー配列の増幅を確認した。

【0097】

(2-2) 蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)

FISH解析は、松原ら(FISH実験プロトコル, 秀潤社, 1994)に記された方法に従い、ヒト特異的プローブCot1(ギブコBRL)を用いて行った。プラストサイジン耐性のCHO株のうちの2株(CHO(#21)bsd79-1及びCHO(#21)bsd79-3)について解析したところ、いずれも観察した分裂像のほとんどにおいて短縮したヒト21番染色体が検出された。代表的なFISH像を図7に示す。図7においてaはテロメアトランケーションを行う前の全長のヒト21番染色体を、bは長腕遠位を削除したヒト21番染色体断片を示している。宿主であるCHO細胞の染色体との相対的な大きさから、短縮したヒト21番染色体がCHO細胞に移入されたことが確認された。

以上の(1)及び(2)の実験から、得られたプラストサイジン耐性CHO株は長腕遠位を削除しloxP配列を挿入したヒト21番染色体部分断片(HACベクター)を保持することが確かめられた。

【0098】

〔実施例4〕ヒト21番染色体由来HACベクターのヒト細胞株への移入及びヒト21番染色体由来HACベクターの培養細胞における安定性の確認

(1) 微小核細胞融合と薬剤耐性クローンの単離

染色体供与細胞として、実施例3で得られた、長腕遠位を削除してloxP配列を挿入したヒト21番染色体に基づくHACベクターを保持するCHO細胞(CHO(#21)bsd-79-1)を用いた。染色体受容細胞としてはヒト線維肉腫細胞株HT1080(ATCCより入手, 登録番号CCL-121)を用いた。はじめに約 10^7 個のCHO(#21)bsd-79-1細胞からミクロ

セルを調製した。すなわち、 25 cm^2 遠心用フラスコ（コースター）6本に細胞密度が60～70%飽和程度まで培養したCHO（#21）bsd-79-1細胞をコルセミド（ $0.075\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ，デメコルシン，和光純薬）を含む培養液（10%FBS， $8\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ブラストサイジン，F12）中で48時間培養して微小核を誘導した。培地を除いた後、予め保温（ 37°C ）しておいたサイトカラシンB（DMEM中に $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ，シグマ）溶液を遠心用フラスコに満たし、アクリル性遠心容器に遠心用フラスコを挿入し、 34°C ，8,000rpm，1時間の遠心を行った。マイクロセルを無血清培地（DMEM）に懸濁して回収し、フィルターで濾過して精製した。HT1080細胞を80%飽和の状態まで培養した6cm径ディッシュに精製した微小核細胞を加えPEG溶液で融合した。48時間後にトリプシン処理により細胞を分散し、ブラストサイジン（ $8\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を含む選択培地（10%CS，DMEM）で培養した。約2週間の選択培養の後、出現した薬剤耐性のコロニーを単離し、以後の解析を行った。2回の微小核細胞融合から計12のブラストサイジン耐性HT1080株を得た。

【0099】

（2）移入染色体の確認

（2-1）PCR法

移入染色体は、ブラストサイジン耐性遺伝子のPCR増幅により確認した。用いたオリゴヌクレオチドプライマーの配列を次に示す。

Bsd2687F：5'-CAACAGCATCCCCATCTCTG（配列番号19）

Bsd2891R：5'-GCTCAAGATGCCCTGTCT（配列番号20）

ブラストサイジン耐性のHT1080細胞12株のすべてににおいて、耐性遺伝子配列の増幅を確認した。

【0100】

（2-2）染色体解析

染色体解析は、黒木ら（細胞工学ハンドブック，羊土社，1992）に記された方法に従い、ギムザ染色により行った。ブラストサイジン耐性のHT1080株のうち4株（HT1080（#21）bsd79-1-3，6，11，14）

について約20の分裂中期染色体像を解析した。プラストサイジン耐性株では、親株のHT1080には認められず、内在の21番染色体よりサイズの小さいミニ染色体が観察された。

以上の(1)及び(2)の実験から、得られたプラストサイジン耐性HT1080株は長腕遠位を削除し10xP配列を挿入したヒト21番染色体部分断片(HACベクター)を保持することが確かめられた。

【0101】

(3) 非選択培養条件下での長期継代培養

長腕遠位を削除したヒト21番染色体の培養細胞における安定性を確認するために、非選択条件下で長期継代培養を行った。用いたのは先に記載したニワトリ細胞株(DT40(#21)bsd-79)、ヒト細胞株(HT1080(#21)bsd79-1-3, 6, 11, 14)である。ニワトリ細胞株用の非選択培養液は10%FBS, 1%ChS, 50 μ M 2-メルカプトエタノールを加えたDMEMであり、選択培養液はこれにプラストサイジン8 μ g/ml(DT40(#21)bsd-79の場合)を添加した。ヒト細胞株用の非選択培養液は10%CSを加えたDMEMであり、選択培養液はこれにプラストサイジン4 μ g/mlを添加した。ニワトリ細胞株は1.5 $\times 10^7$ 細胞を10cm径ディッシュに播種し、1日後に細胞を計数して再び1.5 $\times 10^7$ 細胞を10cm径ディッシュに播種した。ヒト細胞株は5.0 $\times 10^5$ 細胞を10cm径ディッシュに播種し、3日後に細胞を計数して再び5.0 $\times 10^5$ 細胞を10cm径ディッシュに播種した。ニワトリ細胞株は培養開始から21日、42日、63日、84日、105日及び126日後に、ヒト細胞株は10日及び20日後にそれぞれ細胞を回収し、染色体標本作製した。

【0102】

(4) 染色体解析

ニワトリ細胞における人工染色体の検出は、松原ら(FISH実験プロトコル, 秀潤社, 1994)に記された方法に従い、ヒト特異的プローブCot1(ギブコBRL)を用いたFISH法により行った。間期核500個においてヒト染色体を有無を観察し、保持率を算出した。ヒト細胞における人工染色体の検出

は、黒木ら（細胞工学ハンドブック，羊土社，1992）に記された方法に従いギムザ染色法により行った。分裂中期染色体像20個においてミニ染色体の有無を観察して保持率を算出し、4クローンの平均値を出した。その結果を表1に示す。

【0103】

【表1】

#21ΔqHACの安定性

宿主細胞	細胞集団倍加数	HAC保持率(%)	
		薬剤選択なし	薬剤選択あり
DT40	118	99	100
	236	99	100
HT1080	10	100	93
	22	97	98

【0104】

ヒト21番染色体部分断片は、DT40細胞内では非選択培養条件下で分裂回数200回を越えても安定に保持されていた。また分裂中期の染色体像100個を観察して細胞あたりのヒト染色体数を数えたところ、例外なく1本が認められた。一方HT1080細胞株の培養は継続中であるが、現時点（分裂回数22回）ではヒト21番染色体部分断片は選択培養条件下で安定に保持されている。また分裂中期の染色体像を観察したところ、細胞あたり1ないし2本の染色体部分が認められた。

【0105】

以上の（3）及び（4）の実験により、ヒト21番染色体の長腕遠位を削除した部分断片はDT40細胞株及びHT1080細胞株において非選択培養条件下で安定に保持されること、また細胞あたりのコピー数は維持されていることが明らかとなった。

【0106】

〔実施例5〕ヒト21番染色体由来HACベクターへのGFP遺伝子挿入

図8に、ヒト21番染色体由来HACベクターへGFP遺伝子を挿入する方法を示した。実施例1～4に記載のように、テロメアトランケーションにより長腕

遠位を削除し、長腕近位に $loxP$ サイトを導入したヒト 21 番染色体由来 HAC ベクターを用意した。一方で $loxP$ 配列を含む GFP 発現プラスミドを準備し、Cre 組換え酵素を一過性に発現させることで $loxP$ 配列間の部位特異的組換え反応により人工染色体に挿入することとした。組換え挿入体の選別は、G418 耐性の獲得（プロモーター分断型の neo 遺伝子発現ユニットの再構成）を指標とした。

【0107】

(1) $loxP$ 配列を含む GFP 発現プラスミドの構築

GFP 発現ベクター PEGFP-C1（クロンテック）を制限酵素 $GbLII$ 及び $BamHI$ （ニッポンジーン）で消化して 4.7 kb の DNA 断片を単離／精製し、DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造）により自己環状化した。大腸菌 DH5 α の形質転換により組換えプラスミドを単離し、マルチクローニングサイト内の $GbLII$ から $BamHI$ までの 51 bp を欠失したプラスミド（PEGFP-C1 Δ ）を得た。この PEGFP-C1 Δ を鋳型とし、EGFP 遺伝子の発現ユニットを PCR により増幅した。

GenBank のデータベースより入手した塩基配列（アクセッション番号 U55763）をもとに作製したプライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す：

EcoGFP5 : 5' - GGCCGAATTCGTTATTACCGCCATGCAT（配列番号 21）

BamGFP3 : 5' - CCGGGATCCCACAACCTAGAATGCAGTG（配列番号 22）

【0108】

増幅した EGFP 遺伝子の発現ユニットの両端を制限酵素 $EcoRI$ 及び $BamHI$ （ニッポンジーン）で消化して突出末端とし、 $loxP$ 配列と hCMV プロモーターを備えたプラスミドベクター PBS226（ライフテック）の $EcoRI$ / $BamHI$ サイトにクローニングした。

【0109】

(2) トランスフェクション及び G418 耐性クローンの単離

実施例 3 で作製したヒト 21 番染色体由来 HAC ベクターを保持する CHO 細胞（CHO（#21）bsd79-1）をトリプシン処理し、 5×10^6 細胞を

0. 8 ml のリン酸バッファー (PBS) に懸濁した。10 μ g の PBS 226 /EGFP プラスミドと 20 μ g の Cre 酵素発現ベクター PBS 185 (ライフテック) 存在下でジーンパルサー (バイオラッド) を用いてエレクトロポレーションを行った。容量 25 μ F のコンデンサに 750 V で印加し電極間距離 4 mm のエレクトロポレーションセルを用いて放電した。エレクトロポレーションした細胞を 10 % 牛胎児血清 (FBS) を添加したイーグル F12 培地 (以下 F12 という; インビトロジェン製) を含む 100 mm 組織培養用プラスチックシャーレ (ファルコン) 10 枚に播種した。2 日後に 800 μ g/ml の G418 (GENETICIN, シグマ) と 8 μ g/ml のブラストサイジン (Blasticidin S Hydrochloride, フナコシ) を含む培地と置き換えた。2~3 週間後には耐性コロニーが出現し、その頻度は CHO 細胞 5×10^6 あたり 20 個であった。コロニーを単離して増殖させ、以後の解析を行った。

【0110】

(3) ヒト 21 番染色体由来 HAC ベクターに挿入された GFP 遺伝子の発現
単離した G418/ブラストサイジン耐性 CHO 株を蛍光顕微鏡下で観察した。その結果 19 クローンで GFP の発現が確認された。代表的な蛍光顕微鏡像を図 9 に示す。

(4) 相同組換え体の確認

相同組換え体を確認するため、サザンブロット解析を行った。サザンブロット解析は G418 耐性遺伝子及び GFP 遺伝子の一部をプローブとして、制限酵素 EcoRI ないし BamHI (ニッポンジーン) で処理した約 5 μ g のゲノム DNA に対して行った。GFP プローブはプラスミド PEGFP-C1 (クロンテック) を制限酵素 NheI 及び GbLII (ニッポンジーン) により消化して得た 849 bp の断片を調製して用いた。G418 耐性遺伝子のプローブはプラスミド pSV2neo を制限酵素 GbLII 及び SmaI (ニッポンジーン) により消化し、1000 bp の断片を調製して用いた。プローブは 32 P により標識し、シグナルはイメージアナライザー BAS 2000 (富士写真フィルム) により検出した。図 10 にその結果の一例を示す。図 10 では EcoRI 消化した DNA を neo プローブによって検出している。レーン 1 はインサート挿入前の DT

40株、レーン2以降はG418耐性DT40株を示す。挿入前のアレルでは5.7kb、挿入後のアレルでは6.9kbのシグナルが検出される。

以上の(1)～(4)の実験より、解析したG418耐性株19株のうち18株で相同組換えのアレルが検出された。このうち5株では相同組換えのアレルに加えて組換え前のアレルが、1株でランダム挿入のアレルが検出された。したがって目的とする組換え体を得られた頻度は12/19(63%)となる。

【0111】

〔実施例6〕ヒト21番染色体短腕の削除

(1) テロメア短縮のためのコンストラクト構築

ヒト21番染色体の短腕遠位を削除するためのテロメアトランケーションベクターはPBS-TEL/Puro (Kuroiwa, Nucleic Acids Res., 26:3447, 1998) を改変して構築した。PBS-TEL/Puroよりピューロマイシン耐性遺伝子の発現ユニット1.7kbを制限酵素Not Iの断片として取り除き、末端をT4 DNA Polymerase (DNA Blunting kit, 宝酒造) により平滑化した (PBS-TELベクター)。PGKhygro/ Δ LT20を制限酵素Cla I及びSma I (ニッポンジーン) により消化し、PGKプロモーター制御下のハイグロマイシン耐性遺伝子発現ユニットを1.8kbの断片として単離・精製し、PBS-TELベクターにクローニングした (PBS-TEL/Hygro)。

GenBankデータベースより得たヒト21番染色体長腕近位の塩基配列 (登録番号AL163201) から、テロメアトランケーションベクター挿入の標的配列を設計した。これをPCR増幅するための、制限酵素Spe IないしBam H Iの認識配列を付加したプライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す:

Spe31203 : 5'- GCACTAGTCTGGCACTCCTGCATAAACA (配列番号23)

Bam36192 : 5'- CTAAGGATCCATTTTCAGCCTGTGGGAATCA (配列番号24)

【0112】

ヒト21番染色体を保持するDT40雑種細胞から抽出したゲノムDNAを鋳型として標的配列をPCRにより増幅した。これを制限酵素Spe I及びBam H I (ニッポンジーン) で消化して、突出末端をもつ約5kbのDNA断片をアガロースゲル電気泳動により分離し、精製した。これをPBS-TEL/Hygro

r o プラスミドの X b a I / B a m H I サイトにクローニングした。最終的な P B S - T E L / H y g r o コンストラクトのサイズは約 5.8 k b である。テロメアトランケーションベクター、標的配列、及び相同組換えにより生じる染色体アレルを図 11 に示した。

【0113】

(2) トランスフェクション及びハイグロマイシン耐性クローンの単離

P B S - T E L / H y g r o コンストラクトを制限酵素 B a m H I (ニッポンジーン) により消化して線状化し、長腕遠位を削除して l o x P サイトを組み込んだヒト 21 番染色体を保持する D T 40 雑種細胞 (D T 40 (#21) b s d 79) に導入した。D T 40 雑種細胞 1×10^7 を 0.75 ml の P B S に懸濁し、25 μ g DNA 存在下でジーンパルサー (バイオラッド) を用いてエレクトロポレーションを行った。容量 25 μ F のコンデンサに 750 V で印加し電極間距離 4 mm のエレクトロポレーションセルを用いて放電した。エレクトロポレーションした細胞を 10% 牛胎仔血清 (F B S)、1% ニワトリ血清 (C h S) 及び 50 μ M 2-メルカプトエタノールを添加した D M E M 培地 (インビトロジェン製) に懸濁し、96 穴クラスター (ファルコン) 5 枚に播種した。2 日後に終濃度 1.5 mg/ml となるようハイグロマイシン (Hygromycin-B, 和光純薬) を加えた。2~3 週間後には耐性コロニーが出現した。計 2 回のトランスフェクションから合計 63 個の薬剤耐性コロニーを単離して増殖させ、以後の解析を行った。

【0114】

(3) 相同組換え体の選別とテロメア短縮の確認

(3-1) P C R 解析

ハイグロマイシン耐性 D T 40 株から相同組換え体を選別するための 1 次スクリーニングとして P C R 解析を行った。ハイグロマイシン耐性株より抽出したゲノム DNA 約 0.1 μ g を鋳型としてヒト 21 番染色体の短腕近位に位置する S T S マーカー (p C H B, D 21 S 188, D 21 S 275) を増幅した。その代表的な結果を図 12 に示す。図 12 には、左側にヒト 21 番染色体の G バンド像に基づく模式的な染色体地図を、またマーカーについてはどのバンドに位置す

るかを示した。ハイグロマイシン耐性DT40株について、PCRにより期待される増幅産物が検出されたマーカーは■で、検出されなかったマーカーを□で示した。DT40 (#21) は、テロメアトランケーションを行う前の細胞である。テロメアトランケーションにより短腕遠位が削除された場合、D21S275を保持し、D21S188及びpCHBを保持しないことが予想される。D21S188ないしpCHBのいずれかを増幅しない45株を選別し、サザンブロット解析を行った。

【0115】

(3-2) サザンブロット解析

相同組換えの標的配列内にプローブを設定した。プローブは以下に示すオリゴヌクレオチドプライマー対を用い、ヒト21番染色体を保持するDT40雑種細胞のゲノムDNAを鋳型としてPCRにより増幅、単離、精製した。

#21p91203: 5'- CTGGCACTCCTGCATAAACA (配列番号25)

#21p91976: 5'- TCTGTGTTCCCCTTCTCTGA (配列番号26)

【0116】

ハイグロマイシン耐性株から抽出したゲノムDNA約10 µgを制限酵素HindIII (ニッポンジーン) により消化し、サザンブロット解析を行った。塩基配列から予想される制限酵素断片長は相同組換え体で5.8 kb、野生型 (非組換え体) で1.9 kbであり、1次スクリーニングで見出した候補45クローンのうち2クローンが相同組換え体であることを確認した (図13)。

【0117】

(3-3) PCR法

組換えの標的部位を挟んだ配列をPCRにより増幅した。ヒト21番染色体上とターゲティングベクター上に設定したプライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す:

Hyg968: 5'- AAGTACTCGCCGATAGTGGAAC (配列番号27)

#21p96705: 5'- AGTTAGCCTACCTTTTGGCCATCC (配列番号28)

【0118】

増幅産物のサイズは5.9 kbであり、これを制限酵素NsiIにより消化す

ると、1. 4 kb、2. 6 kb及び1. 9 kbの断片が生じると予想される（図 11）。サザンブロット解析で相同組換えアレルが確認された2クローンでのみPCR増幅が認められ、制限酵素消化による部分断片の生成を確認した（図 14）。

【0119】

（3-4）蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）

FISH解析は、松原ら（FISH実験プロトコル，秀潤社，1994）に記された方法に従い、ヒト特異的プローブCot1（ギブコBRL）を用いて行った。その結果観察した分裂像のほとんどにおいて短縮したヒト21番染色体が検出された（図15）。

以上の（1）～（3）の実験より、得られたハイグロマイシン耐性63株のうち2株が短腕削除により短縮したヒト21番染色体を保持することが確かめられた。

【0120】

〔実施例7〕ヒト21番染色体由来HACベクターへのEPO遺伝子挿入

実施例5に記載のGFP遺伝子の場合と同様にして、ヒト21番染色体由来HACベクターへヒトEPO遺伝子を挿入する。実施例1～4に記載のように、テロメアトランケーションにより長腕遠位を削除し、長腕近位にloxPサイトを導入したヒト21番染色体由来HACベクターを用意した。一方でloxP配列を含むヒトEPO発現プラスミドを準備し、Cre組換え酵素を一過性に発現させることでloxP配列間の部位特異的組換え反応により人工染色体に挿入することとした。組換え挿入体の選別は、G418耐性の獲得（プロモーター分断型のneo遺伝子発現ユニットの再構成）を指標とした。

【0121】

（1）loxP配列を含むヒトEPO発現プラスミドpLN1-EPOの構築

プラスミド構築に用いたプライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す：

SV40polyANp1: 5' - CGG GAT CCC TCG AGC GAG ACA TGA TAA GAT ACA TTG ATG
- 3'（配列番号29）

SV40polyARp1: 5' - GGA AGA TCT TCC TAA TCA GCC ATA CCA CAT TTG TAG AGG

- 3' (配列番号 30)

プラスミドベクター pSTneoB (加藤ら、Cell Struct Funct, 12:575-580, 1987) の塩基配列を基にして作製した。

【0122】

CMVNp3: 5' - CGG AAT TCC GGA CAT TGA TTA TTG ACT AGT TAT TAA TAG -3' (配列番号 31)

CMVRp1: 5' - CGG GAT CCC GGG TGT CTT CTA TGG AGG TCA AAA CAG - 3' (配列番号 32)

pBS226 の CMV プロモーター塩基配列を基にして作製した。

【0123】

hEPONp1: 5' -CGG GAT CCC GGC CAC CAT GGG GGT GCA CGA ATG TC- 3' (配列番号 33)

hEPORp1: 5' -CGC TCG AGC GCT ATC TGT CCC CTG TCC TGC AGG- 3' (配列番号 34)

Genbank より入手した塩基配列 (アクセッション番号 I05397) を基に作製した。

【0124】

pSTneoB を鋳型として SV40polyANp1 (配列番号 29) 及び SV40polyARp1 (配列番号 30) を用いて PCR 増幅した SV ポリ A 付加ユニットの両端を制限酵素 BamHI 及び BglII (宝酒造) で消化して突出末端とし、loxP 配列と hCMV プロモーターを備えたプラスミドベクター pBS226 (ライフテック) の BamHI サイトにクローニングした。これを pBS226-pA とした。

【0125】

次に、pBS226 を鋳型として CMVNp3 (配列番号 31) 及び CMVRp1 (配列番号 32) を用いて PCR 増幅した CMV プロモーターユニットの両端を制限酵素 EcoRI 及び BamHI (宝酒造) で消化して突出末端とし、pBS226-pA の EcoRI-BamHI サイト間へクローニングした。これを pLN1 とした。

【0126】

最後に、ヒトEPOcDNAを鋳型としてhEPONp1（配列番号33）及びhEPORp1（配列番号34）を用いてPCR増幅したヒトEPOコード領域の両端を制限酵素BamHI及びXhoI（宝酒造）で消化して突出末端とし、pLN1のBamHI-XhoIサイト間へクローニングした。これをpLN1-EPOとした。

【0127】

(2) トランスフェクション及びG418耐性クローンの単離

実施例3で作製したヒト21番染色体由来HACベクターを保持するCHO細胞（CHO（#21）bsd79-1）をトリプシン処理し、 5×10^6 細胞を0.8mlのハンクス平衡塩溶液（HBSS）に懸濁した。上記（1）で作製したpLN1-EPOベクター10 μ gとCre酵素発現ベクターpBS185（ライフテック）10 μ gの存在下でジーンパルサー（バイオラッド）を用いてエレクトロポレーションを行った。容量500 μ Fのコンデンサに450Vで印加し、電極間距離4mmのエレクトロポレーションセルを用いて放電した。エレクトロポレーションした細胞を10%牛胎児血清（FBS）を添加したイーグルF12培地（以下F12という；インビトロジェン製）を含む48穴組織培養用プラスチックシャーレ（ファルコン）4枚に播種した。2日後に800 μ g/mlのG418（GENETICIN、インビトロジェン）と8 μ g/mlのプラストサイジン（Blasticidin S Hydrochloride, フナコシ）を含む培地と置き換えた。2～3週間後には耐性コロニーが出現し、その頻度はCHO細胞 5×10^6 あたり28個であった。コロニーを単離して増殖させ、以後の解析を行った。この細胞を以後KH21E細胞と称する。

【0128】

(3) ヒト21番染色体由来HACベクターに挿入されたEPO遺伝子の発現

ヒトEPO遺伝子の発現は、培養上清中に産生されるヒトEPOタンパク質を酵素結合免疫吸着検定法（ELISA法）により定量した。

単離したG418/プラストサイジン耐性KH21細胞19クローン中6クローンについて、各々 1×10^5 細胞を10%FBS添加した800 μ g/mlの

G418と $8\mu\text{g/ml}$ のプラスタサイジンを含むF12培地2mlをいれた6穴組織培養用プラスチックシャーレ（ファルコン）に播種した。コンフレント到達後、10%FBSを添加したF12培地2mlに置き換え、6日間培養し上清を回収した。ヒトEPO ELISAキット（Quantikine IVD Human EPO Immunoassay, R&Dシステム）により、培養上清中のヒトEPOを定量した。その結果を表2に示す。

【0129】

【表2】

Clone No.	測定値 (mIU/ml)	CM 中の EPO 濃度	
		(IU/ml)	(ug/ml)
C13	16.4	1640	8.2
C15	17.1	1710	8.5
C17	29.5	2950	14.7
C18	41.1	4110	20.5
C21	16.6	1660	8.3
C22	23.9	2390	11.9

以上の結果から、6クローン全てにおいてヒトEPOの発現が確認された。

【0130】

(4) KH21E細胞により産生されたヒトEPOの生物活性

産生されたヒトEPOの生物活性について、ヒトEPO依存的増殖を示すヒト白血病細胞株UT7-EPO細胞（自治医科大学 小松 則夫 先生より入手）の増殖活性を指標にして解析した。KH21E細胞の2株（#C2及び#C18）について培養上清を表2の定量値を基にEPO終濃度0.01, 0.1, 1, 5, 20, 100mIU/mlとなるように加えた10%FBSを添加したIMDM培地（インビトロジェン製）0.1mlをいれた96穴組織培養用プラスチックシャーレ（ファルコン）にUT7-EPO細胞 5×10^3 を播種した。3日間培養後、細胞増殖測定キット（CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay,

プロメガ) により細胞増殖を解析した。

【0131】

その結果を図16に示す。2クローンの培養上清を添加した場合、ともに組換え体ヒトEPOタンパク質(rhEPO; キリンビール) 添加時と同様の用量依存的な吸光度の増加が認められた(図16、C2及びC8)。

以上の結果から、培養上清中に産生されたヒトEPOは、組換え体ヒトEPOタンパク質と同等の生物活性を保持することが確認された。

【0132】

【発明の効果】

本発明により、ヒト人工染色体(HAC) ベクターが提供される。本HACベクターは、その全体のサイズが縮小化されかつ不必要な遺伝子が削除されているため細胞中で安定に保持される。また本HACベクターは、ヒト染色体に基づいて作製されているため、大きなサイズの外来DNAを挿入することが可能である。また本HACベクターには、部位特異的組換え酵素の認識部位が挿入されているため、外来DNAをカセット形式で簡便に導入することができ、またその導入位置を適宜設定することができることから位置効果を受けることもない。さらに本HACベクターを用いることによって、大きなサイズの外来DNAを細胞に導入し、発現させることができる。従って、本HACベクターは、所望のタンパク質をコードする遺伝子の高発現による該タンパク質の生産、機能未知の遺伝子又はタンパク質の生体内機能解析、大きなサイズのDNAのクローニングのために使用することができ、遺伝子工学に関連する分野において有用である。

【0133】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> Human Artificial Chromosome Vector

<130> P02-0713

<160> 34

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 1

cgcggatcca gagagagcct ggaatgcctg gtagtgt

37

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 2

cgcggatccc cagtgccctg agatcttggtg atttctc

37

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 3

gcctggcatc ttcctcaata

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 4

ttgcatgcct gtggtactgt

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 5

tcacaatcat gggctttgaa

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 6

cacgcaacca tttgttcatt

20

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 7

gttgacagaa agtagactgt agcaa

25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 8

tctaaggaac aaatctaggt catgg

25

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 9

ccggaattcc tctgggtttc tggatgaagc

29

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 10

ccggaattct gtagatcctg ccattgtgg

29

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 11

cgcggatcct tggctccaaa aggtaccac

29

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 12

cgcggatccc taccctcgcc actgtgtcc

29

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 13

gttcagaaa agtagactgt agcaa

25

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 14

tctaaggaac aaatctaggt catgg

25

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 15

gggctagcca ttaaagctga

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 16

aaaggaata agggcgacac

20

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 17

ggtttgtcca aactcatcaa tgta

24

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 18

gtcaattcac taattcctat tcccagt

27

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 19

caacagcatc cccatctctg

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 20

gctcaagatg cccctgttct

20

<210> 21

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 21

ggccgaattc cgtattaccg ccatgcat

28

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 22

ccgggatccc acaactagaa tgcagtg

27

<210> 23

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 23

gcactagtct ggcactcctg cataaaca

28

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 24

ctaaggatcc atttcagcct gtgggaatca

30

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 25

ctggcactcc tgcataaaca

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 26

tctgtgttcc ccttctctga

20

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 27

aagtactcgc cgatagtgga aacc

24

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 28

agtttagccta ccttttggcc atcc

24

<210> 29

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 29

cgggatccct cgagcgagac atgataagat acattgatg

39

<210> 30

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 30

ggaagatcctt cctaatacgc cataccacat ttgttagagg

39

<210> 31

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 31

cggaattccg gacattgatt attgactagt tattaatag

39

<210> 32

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 32

cgggatcccg ggtgtcttct atggaggtca aaacag

36

<210> 33

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 33

cgggatcccg gccaccatgg ggggtgcacga atgtc

35

<210> 34

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 34

cgctcgagcg ctatctgtcc cctgtcctgc agg

33

【0134】

【配列表フリーテキスト】

配列番号1～34：合成オリゴヌクレオチド

【図面の簡単な説明】

【図1】

ヒト21番染色体長腕遠位をテロメアトランケーションにより短縮する方法の概要を示す図である。

【図2】

ピューロマイシン耐性DT40株において長腕遠位が削除されたことを示すPCR解析の結果を示す図である。

【図3】

ピューロマイシン耐性DT40株において長腕遠位が削除されたことを示すサザンブロット解析の結果を示す写真である。

【図4】

ピューロマイシン耐性DT40株において長腕遠位が削除されたことを示すFISH解析の結果を示す写真である。aはDT40細胞に保持されているヒト21番染色体（矢印）を示し、bは長腕を削除したヒト21番染色体断片（矢印）を示す。

【図5】

長腕遠位を削除したヒト21番染色体の長腕近位にloxP配列を挿入する方法の概要を示す図である。

【図6】

ブラストサイジン耐性DT40株において相同組換え体を選別するためのサザンブロット解析（A）及びPCR解析（B）の結果を示す写真である。

【図 7】

ブラストサイジン耐性CHO-K1株においてヒト21番染色体（断片）が保持されていることを示すFISH解析の結果を示す写真である。aはテロメアトランケーションを行う前の全長のヒト21番染色体を示し、bは長腕遠位を削除したヒト21番染色体断片を示す。

【図 8】

ヒト21番染色体長腕近位のloxP配列にGFPコンストラクトを挿入する方法の概要を示す図である。

【図 9】

G418耐性CHO-K1株におけるGFP発現の様子を示す蛍光顕微鏡写真である。

【図 10】

G418耐性CHO-K1株では、loxP配列で部位特異的組換えが起きたことを示すサザンブロット解析の結果を示す写真である。

【図 11】

ヒト21番染色体短腕遠位をテロメアトランケーションにより短縮する方法の概要を示す図である。

【図 12】

ハイグロマイシン耐性DT40株において短腕遠位が削除されたことを示すPCR解析の結果を示す写真である。

【図 13】

ハイグロマイシン耐性DT40株において短腕遠位が削除されたことを示すサザンブロット解析の結果を示す写真である。

【図 14】

ハイグロマイシン耐性DT40株において短腕遠位が削除されたことを示すPCR解析の結果を示す写真である。

【図 15】

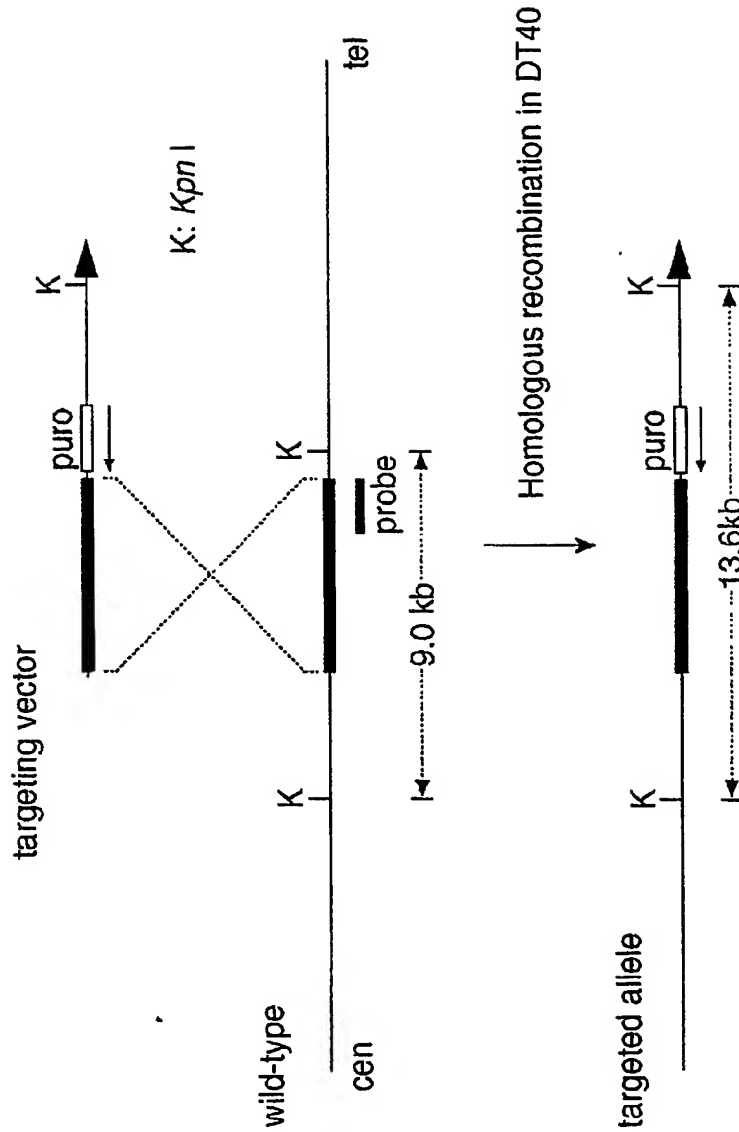
ハイグロマイシン耐性DT40株において短腕遠位が削除されたことを示すFISH解析の結果を示す写真である。

【図16】

KH21E細胞培養上清中に産生されたヒトEPOが組換え体ヒトEPOタンパク質（rhEPO）と同様の細胞増殖活性を保持する結果を示す図である。

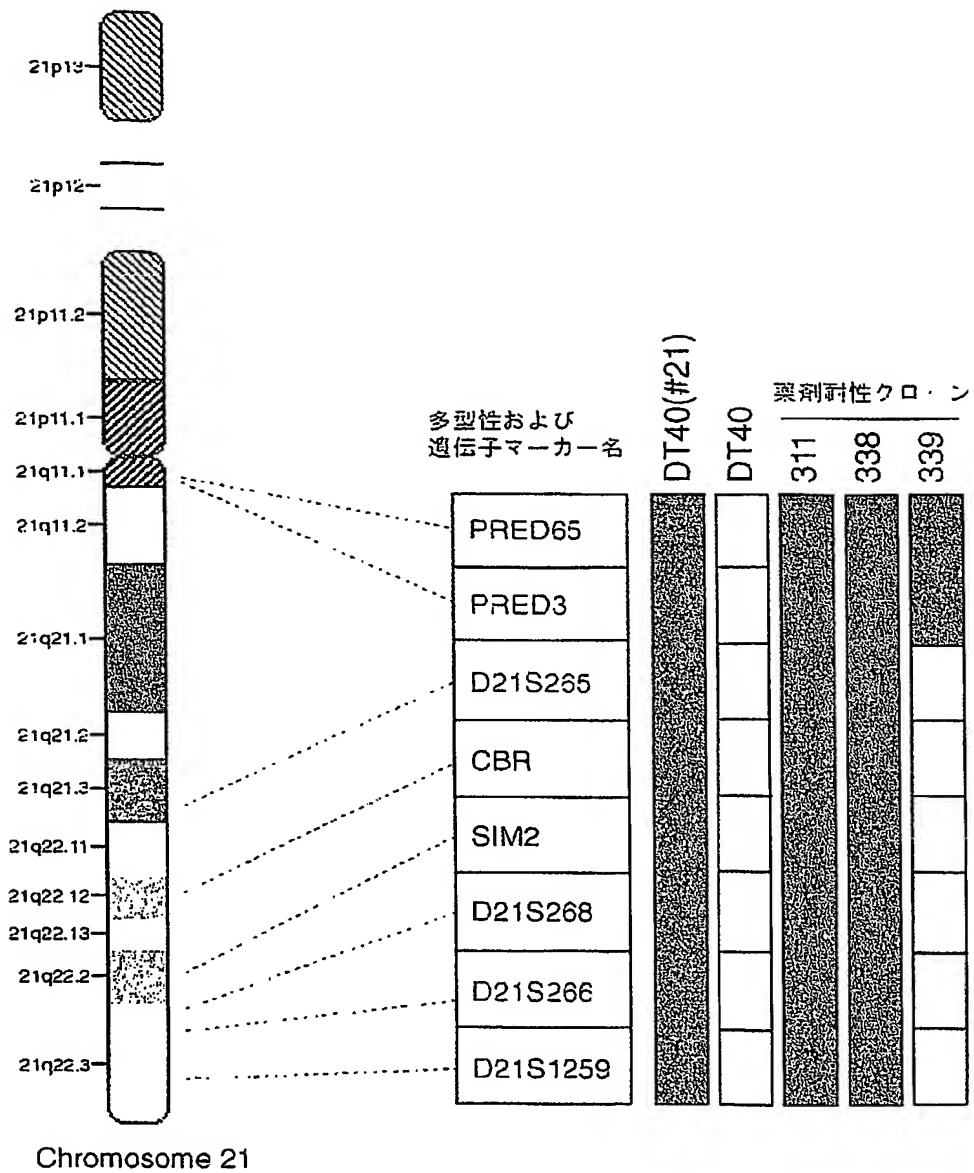
【書類名】 図面

【図 1】



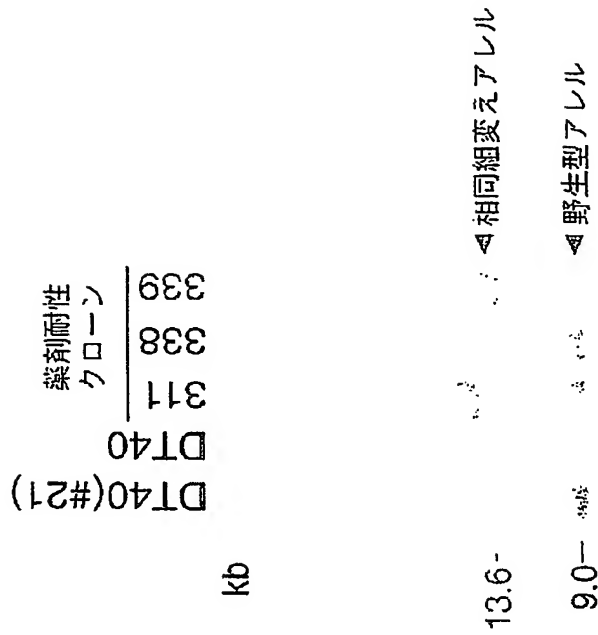
人工テロメア配列の部位特異的導入によるヒト21番染色体長腕遠位の削除

【図 2】



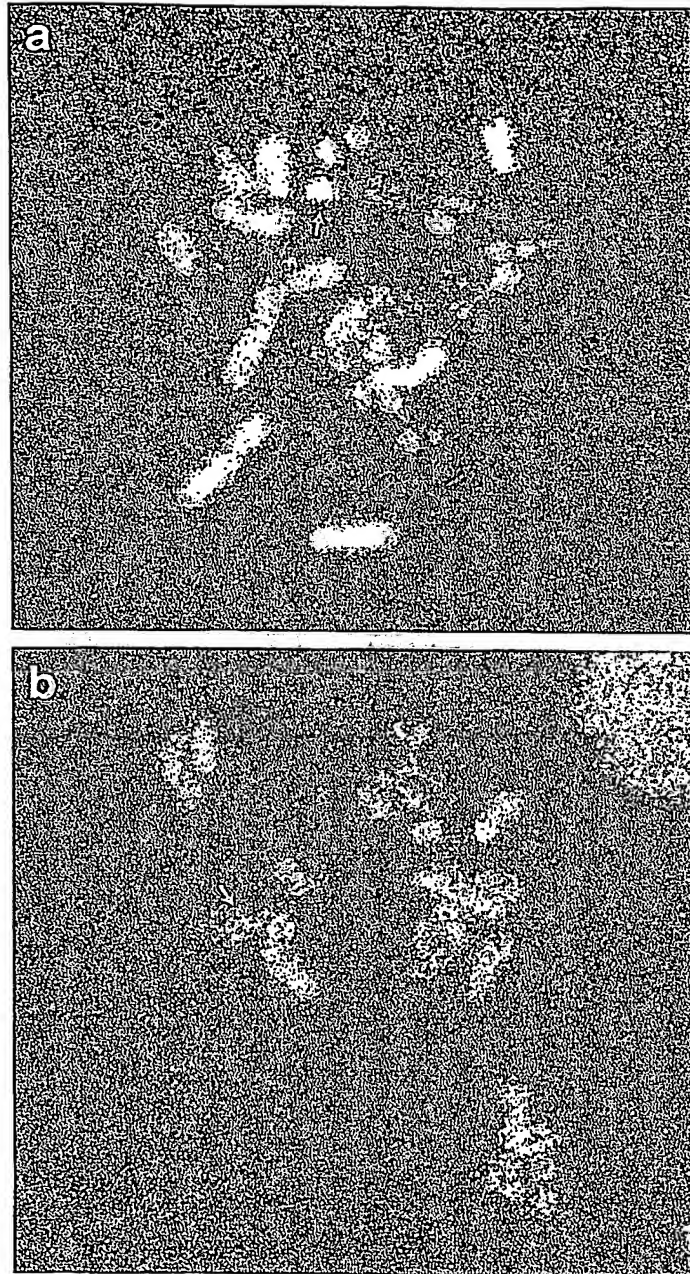
ピューロマイシン耐性DT40株におけるヒト21番染色体長腕遠位の削除（PCR解析）

【図 3】



ピュアロマイシン耐性DT40株における人工テロメア配列の
部位特異的導入（サザン解析）

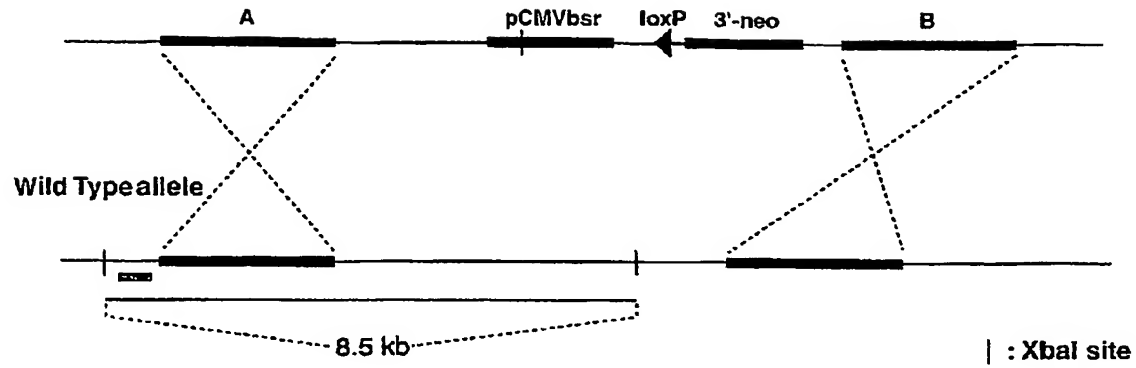
【図4】



DT40細胞に保持されているヒト21番染色体 (a) および
長腕を削除したヒト21番染色体断片 (b) の FISH像

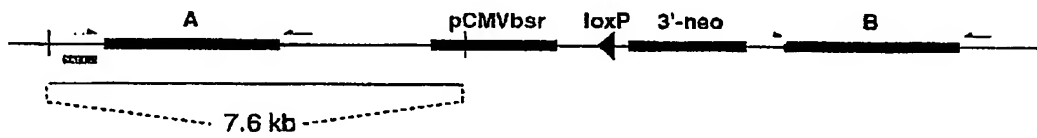
【図 5】

Targeting Vector



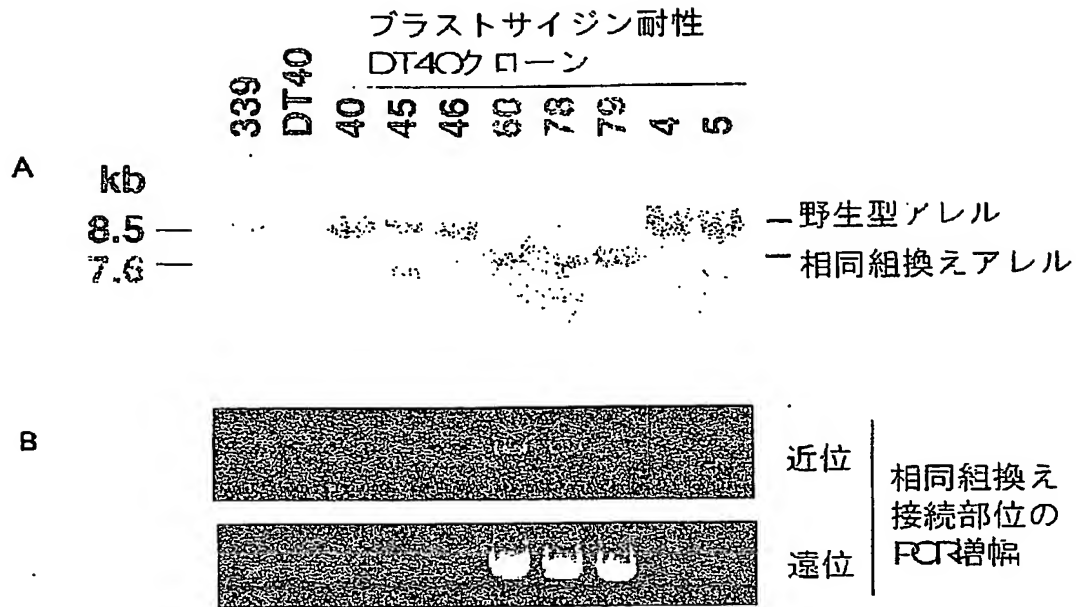
homologous recombination in DT40

Targeted allele



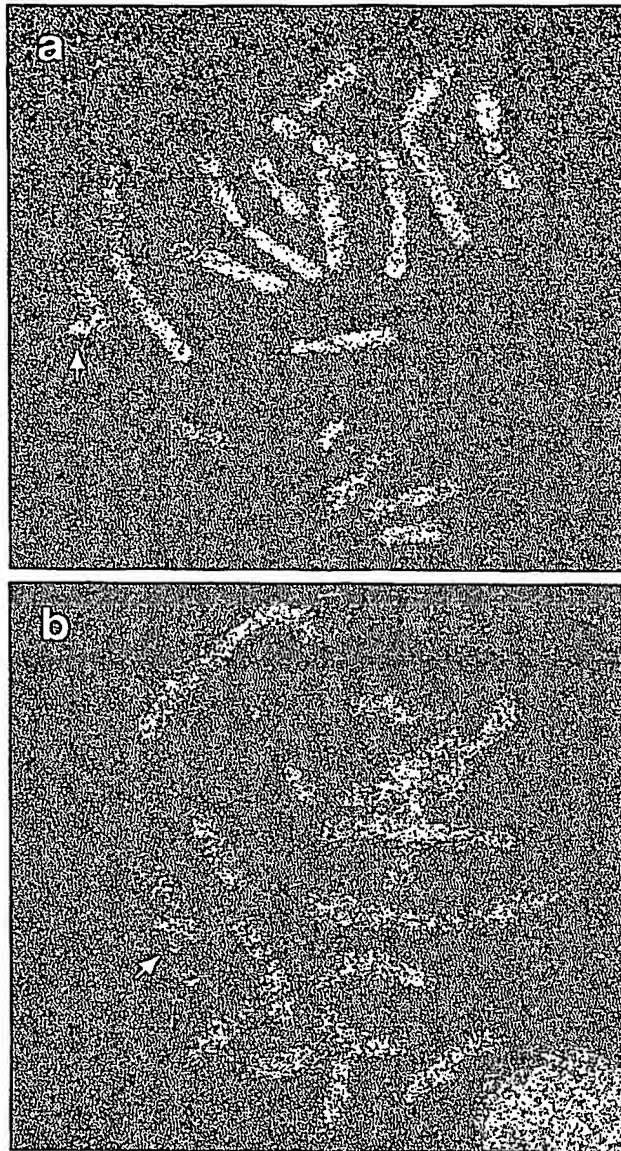
loxP配列 のヒト21番染色体長腕近位への部位特異的挿入

【図 6】



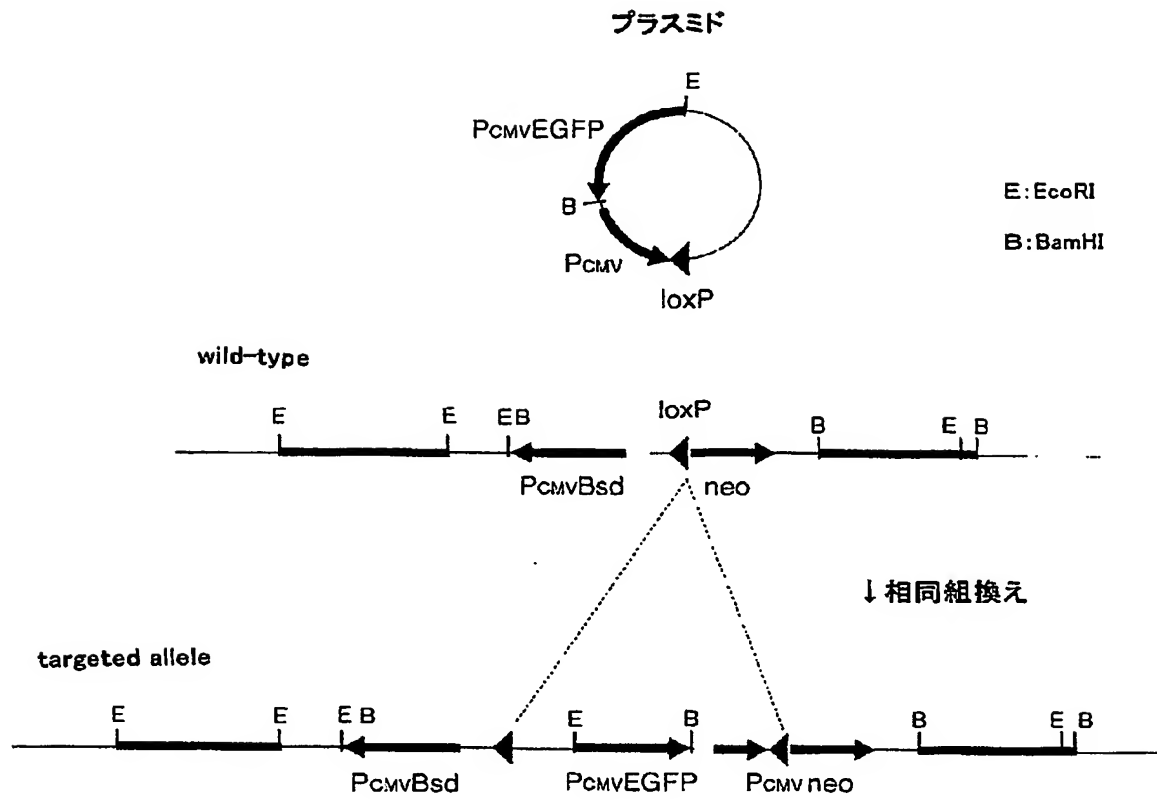
ブラストサイジン耐性DT4C株におけるヒト21番染色体断片上へのloxP配列の部位特異的導入（サザンおよびPCR解析）

【図 7】



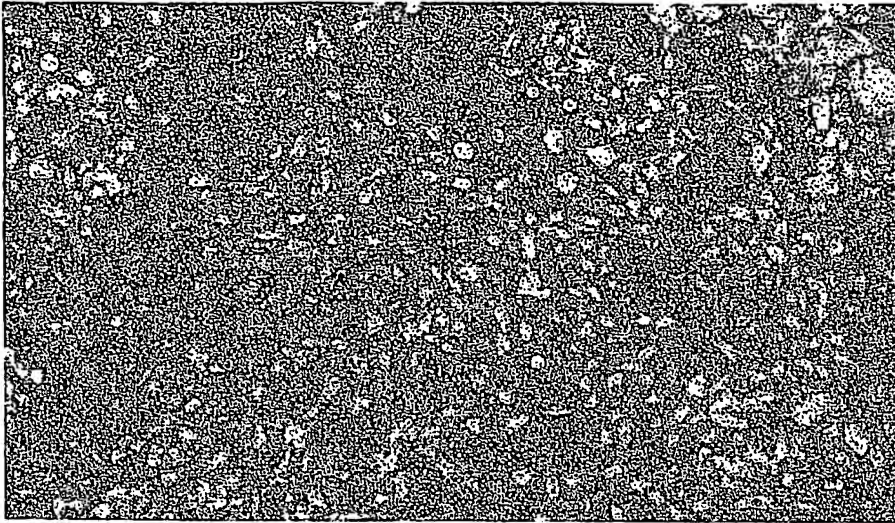
CHO細胞に移入されたヒト21番染色体 (a) および
長腕遠位を削除したヒト21番染色体断片 (b) のFISH像

【図 8】



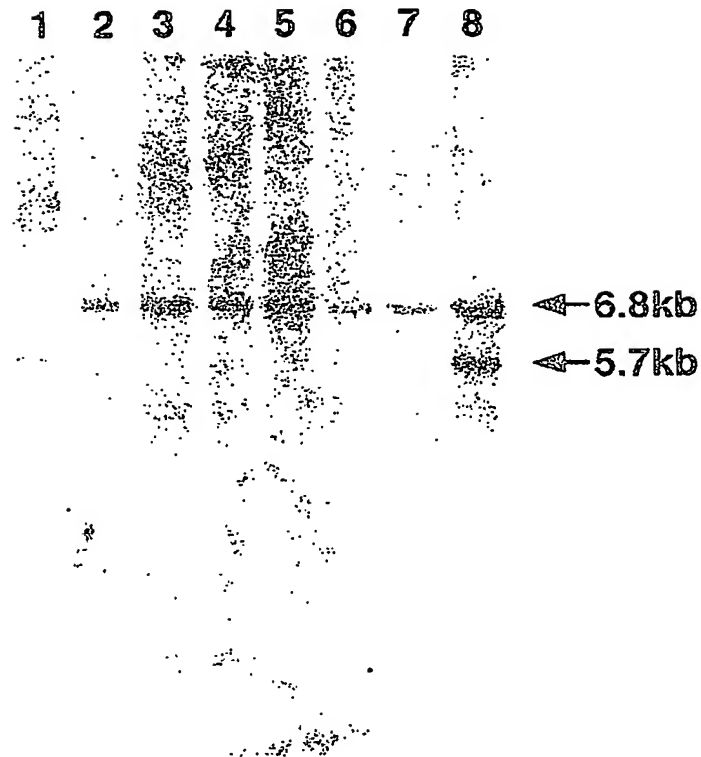
GFP遺伝子発現プラスミドのヒト21番染色体近位 loxPサイト への部位特異的な挿入

【図 9】



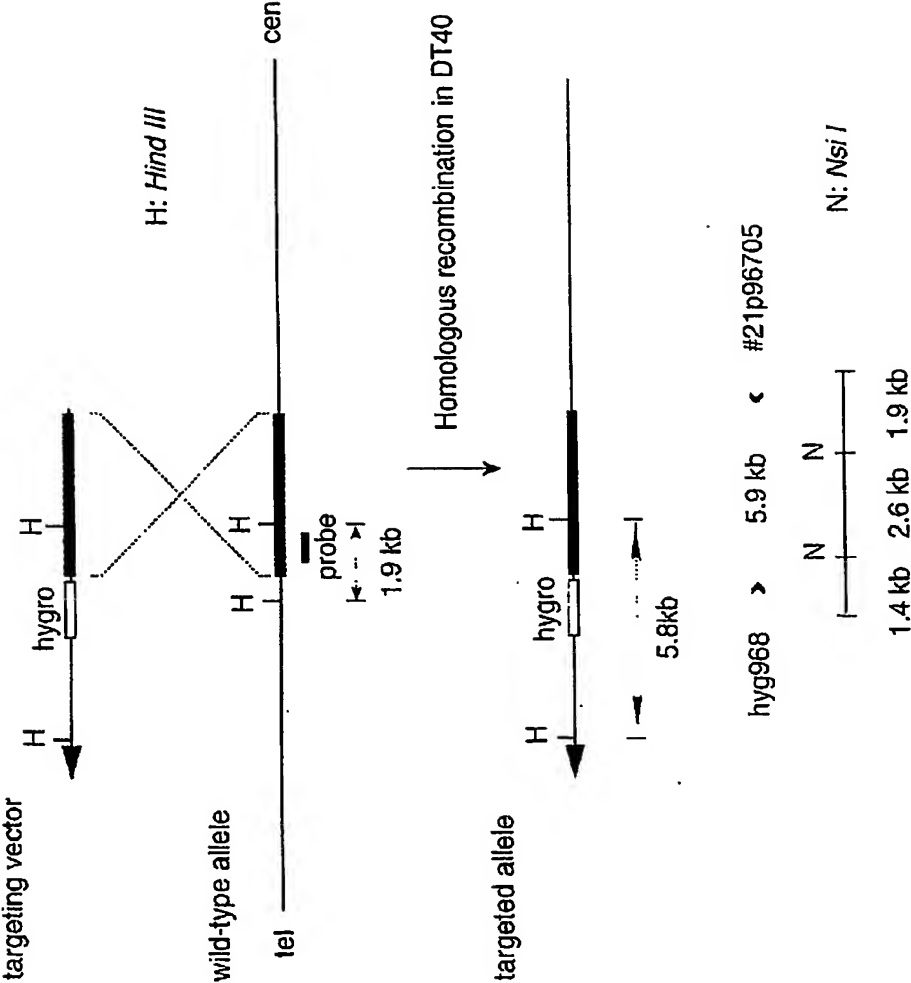
GFP遺伝子を発現するCHO細胞の蛍光顕微鏡像

【図10】



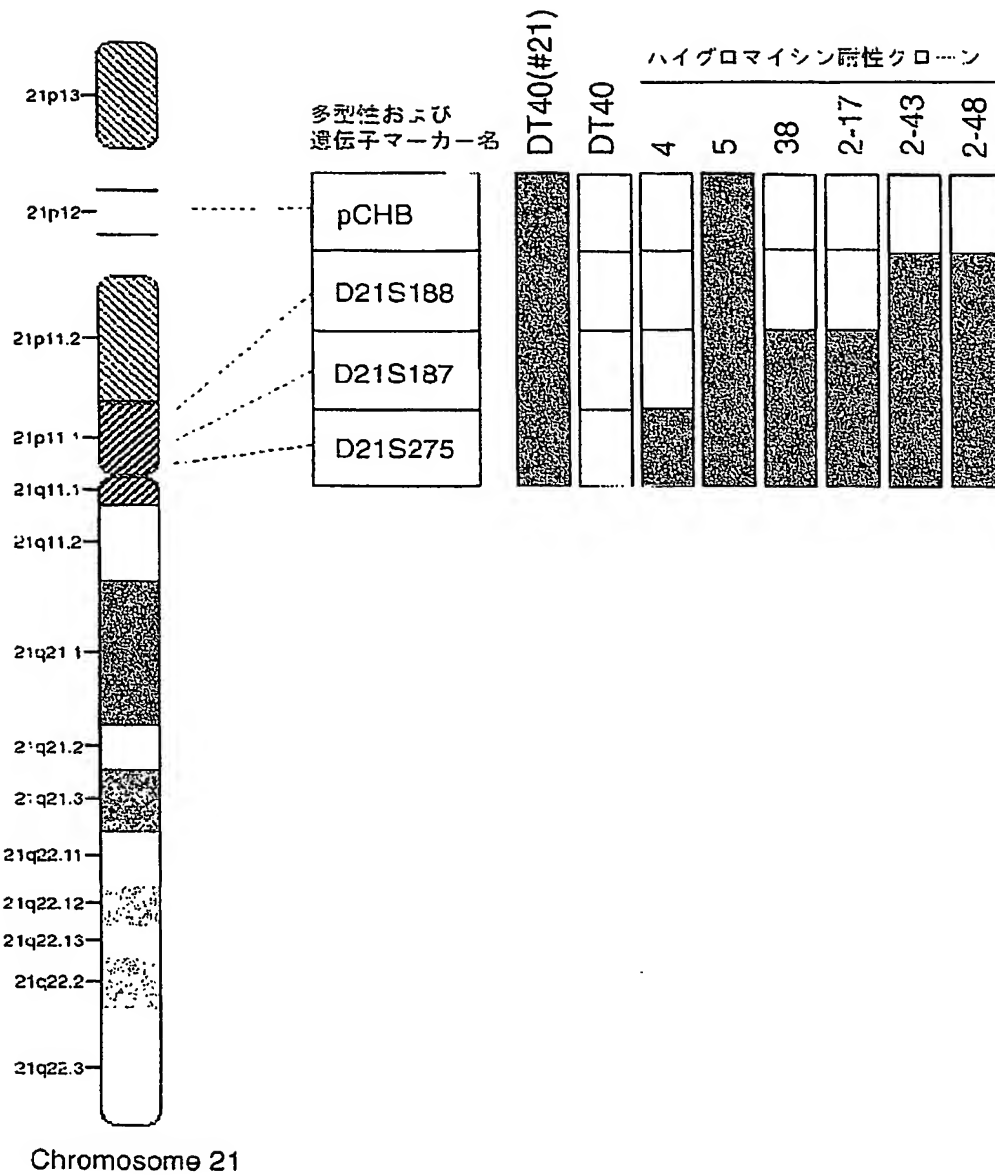
GFP遺伝子のHACへのloxPサイト 特異的挿入
(サザン解析)

【図 11】



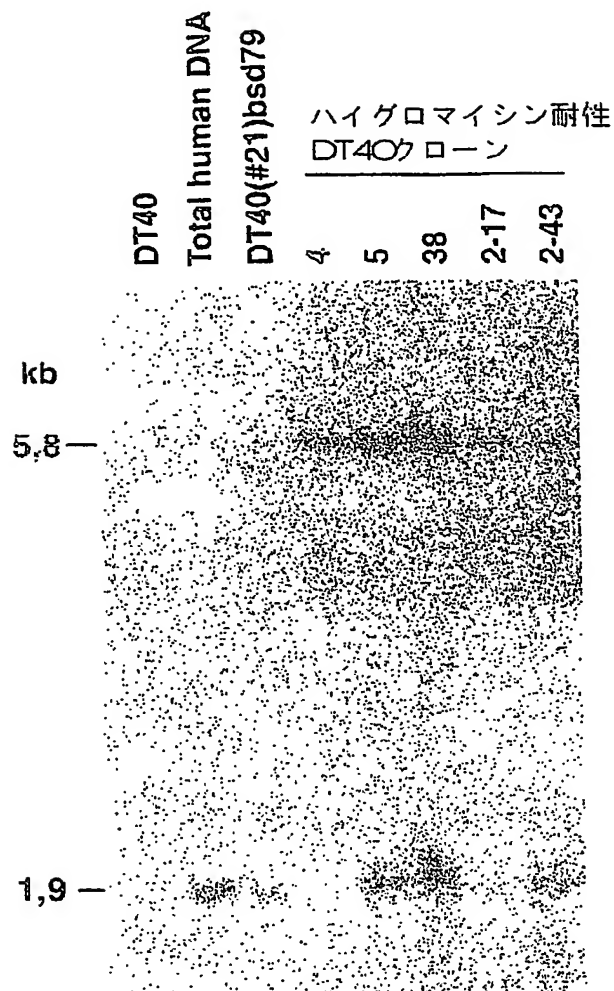
人工テロメア配列の部位特異的導入によるヒト21番染色体短腕遠位の削除

【図 12】



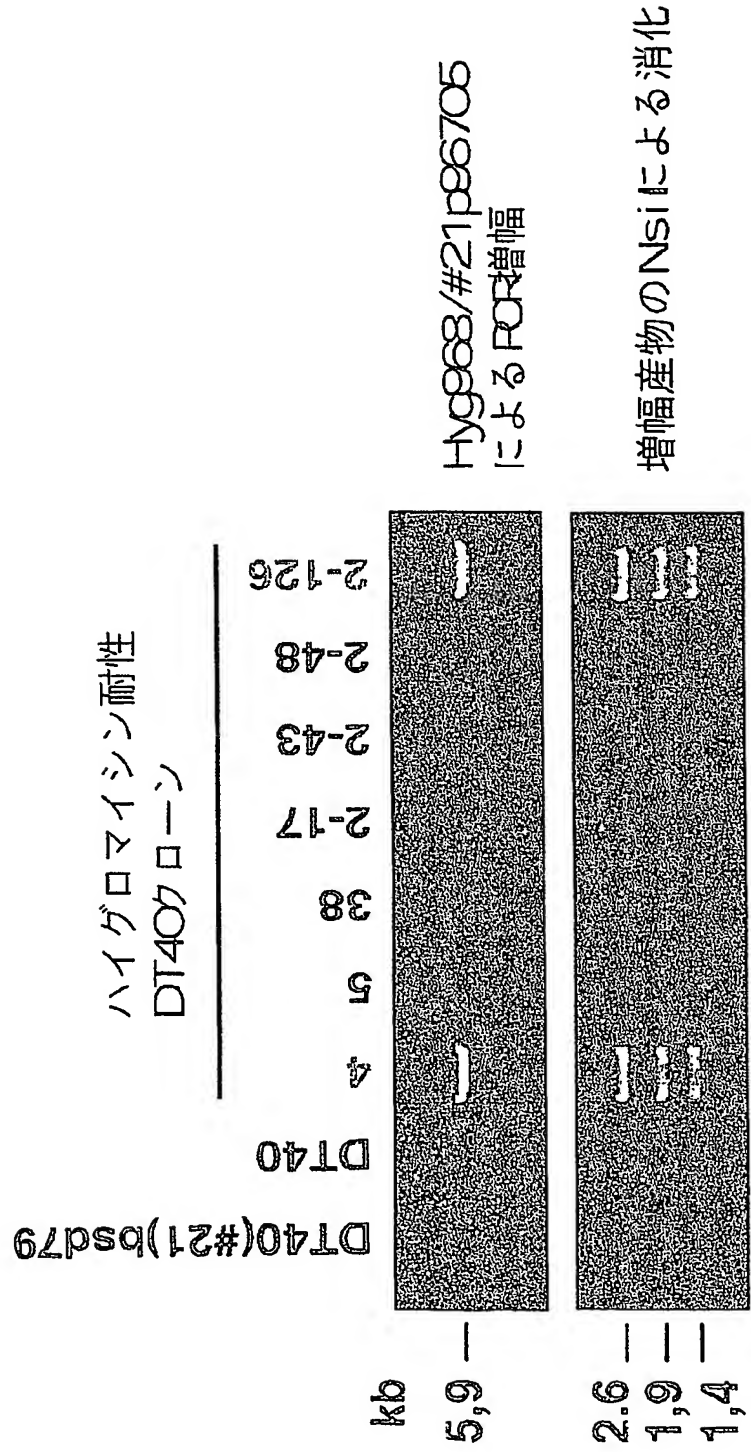
ハイグロマイシン耐性DT40株におけるヒト21番染色体短腕遠位の削除 (PCR解析)

【図 13】



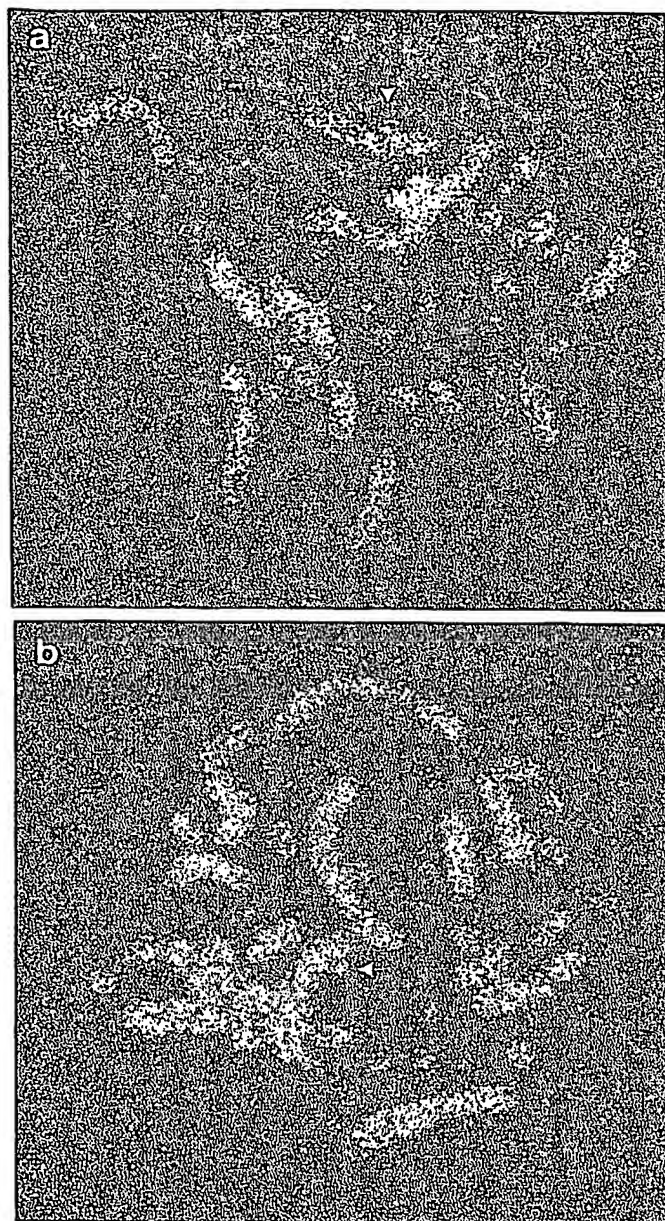
ハイグロマイシン耐性DT40株における人工テロメア配列の
部位特異的導入（サザン解析）

【図14】



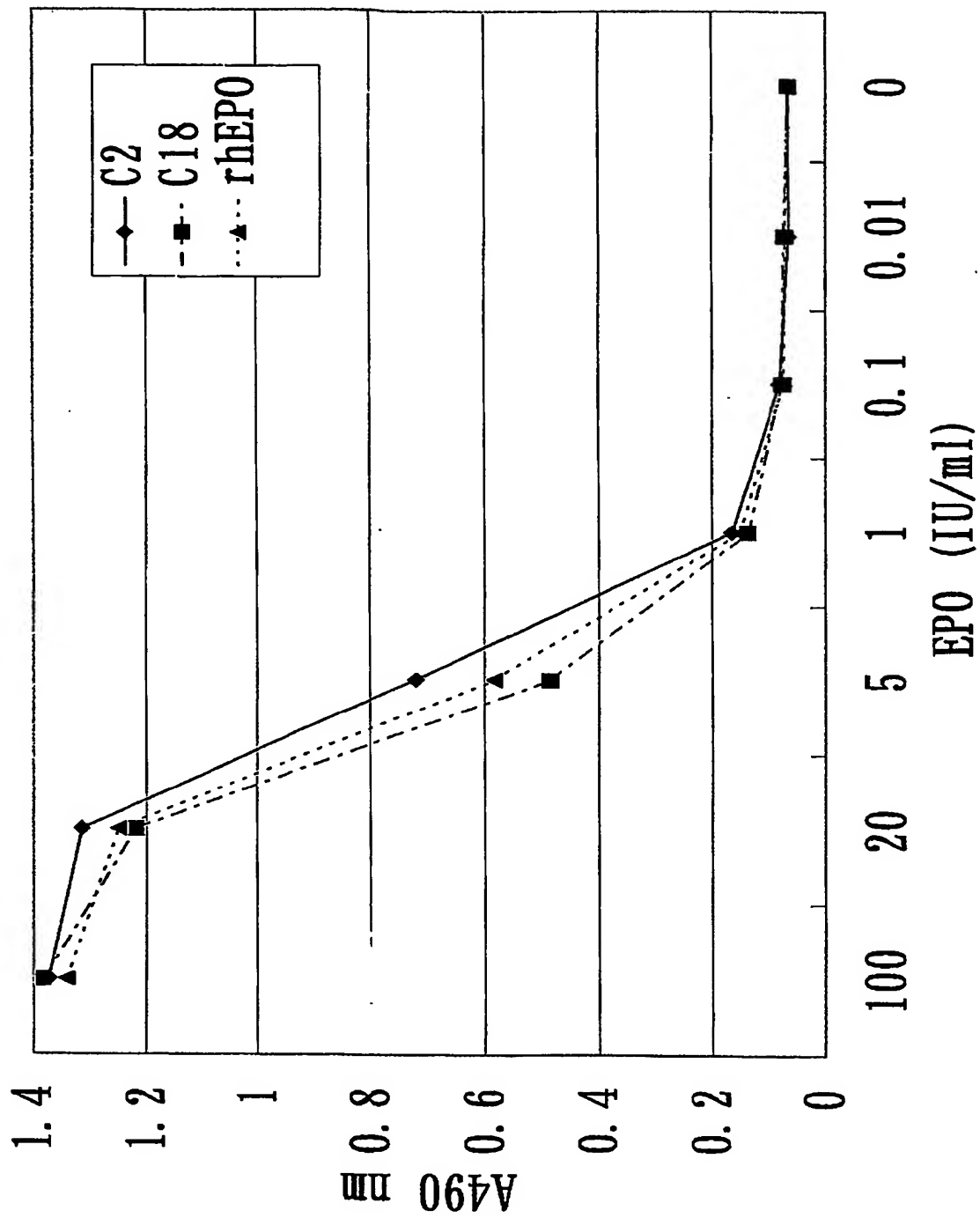
ハイグロマイシン耐性DT40株における人工テロメア配列の
部位特異的導入 (PCR解析)

【図15】



DT4G細胞において長腕 (a) , 長腕および短腕 (b) を
削除したヒト21番染色体断片の FISH像

【図 16】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞中で安定に保持され、大きなサイズの外来遺伝子を簡便に挿入し、細胞に導入することができるヒト人工染色体ベクター及びその作製方法の提供。

【解決手段】 長腕遠位及び／又は短腕遠位が削除されたヒト 21 番染色体断片を含むことを特徴とするヒト人工染色体ベクター。

【選択図】 なし

特願 2002-292853

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000253503]

1. 変更年月日

1995年 6月14日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区新川二丁目10番1号

氏 名

麒麟麦酒株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.